

Aus dem Institut für Bakteriologie und Immunologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Prof. Dr. H. Blobel

Leukozidin bei Staphylokokken vom Hund

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Volker Fiedler
Tierarzt aus Berlin

Gießen 1972

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Bakteriologie und Immunologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Prof. Dr. H. Blobel

Leukozidin bei Staphylokokken vom Hund

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Volker Fiedler
Tierarzt aus Berlin

Gießen 1972

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin in Gießen

Dekan: Professor Dr. E. Weiß

Berichterstatter: Professor Dr. H. Blobel

Tag der mündlichen Prüfung: 2.3.1973



Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. LITERATURÜBERSICHT	4
A. Entdeckung leukozider Substanzen	4
B. Wirkungsweise des Panton-Valentine-Leukozidins	6
C. Biochemische Veränderungen der mit PVL behandelten Zelle	8
D. Nachweis der PVL-Wirkung	9
E. Produktion von PVL	11
F. PVL und seine Antikörper	13
G. Die PVL-Bedeutung bei der Staphylokokkenpathogenität	14
III. MATERIAL UND METHODEN	16
A. Staphylokokkenkulturen	16
B. Blut zur Leukozytenisolierung	17
C. Leukozytenisolierung	18
1. Objektträgeradhäsion	18
2. Hämolysen mit destilliertem Wasser	18
3. Hämolysen mit Ammoniumchlorid	19
D. PVL-Nachweis	25
E. Hämolysennachweis	26
F. Wachstum und Toxinbildung	27
G. Reinigungsversuche	28

	Seite
H. PVL-Antikörper	30
I. Immunelektrophorese	31
IV. ERGEBNISSE	34
A. Merkmale der Staphylokokken- kulturen	34
B. PVL-Bildung	34
C. Wachstum und Toxinbildung	38
D. Reinigungsversuche	43
E. Serologische Untersuchungen	47
F. Immunelektrophorese	50
V. DISKUSSION	52
VI. ZUSAMMENFASSUNG	55
VII. LITERATURÜBERSICHT	56
ANHANG	
LEBENS LAUF	

I. EINLEITUNG

Staphylokokken können beim Hund unter bestimmten anatomischen (BRACK, 1955) und pathophysiologischen Umständen (KRAL und SCHWARTZMAN, 1964; EIKMEIER, 1970) die Schutzschranke der keimabwehrenden Hautsekrete überwinden und durch Mikroläsionen in die Blutgefäße der Haut eindringen. Daraus können spezifische eitrige Erkrankungen der Eintrittspforte entstehen, wie z.B. Follikulitis, Furunkulose und sekundäre eitrige Pyodermien. Bei Verletzungen der Haut durch äußere Gewalteinwirkung sind die so entstandenen Wunden fast immer mit Staphylokokken infiziert (PILLSBURY und NICHOLS, 1946). Als Folge findet sich häufig eine bakterielle Wundinfektion, die im ungünstigsten Fall durch Ausbreitung über die Blutbahn zur Septikämie führen kann (WELLS, 1953). Hämorrhagien und Nekrosen im Verlauf des Magen- und Darmtraktes sowie in der Peritonealhöhle entstehen dabei als Folge der Einwirkung von Staphylokokkentoxinen auf die Endothellage der Kapillaren und durch direkte schädigende Wirkung auf die Gewebezellen selber (RIGDON, 1935).

Aber nicht nur für den Hund selber bilden die an ihm vorhandenen Staphylokokken eine ständige Gefahr. Für die Tiere seiner Umwelt und für den mit ihm zusammenlebenden Menschen kann der Haushund ein Reservoir für pathogene Staphylokokken sein, und gerade diese sind oft therapieresistent (RAJULU, FOLTZ und LORD, 1960).

Ein großes therapeutisches Problem stellen die oberflächlichen und tiefen sekundären pyogenen Dermatitis der Junghunde im Alter von 4 - 12 Wochen dar. Die Möglichkeit einer vorangegangenen Viruserkrankung, die bei manchen Rassen vorliegenden anatomischen Verhältnisse, und die noch mangelhaft ausgebildete körpereigene Krankheitsabwehr lassen diese Fälle oft aussichtslos erscheinen (KRAL und SCHWARTZMAN, 1964). Als Therapie wurde in solchen Fällen die Röntgenbehandlung (POMMER und POBISCH, 1958), die Wismut-Be-

handlung (LEHMAN und FASSETT, 1947; HOWLESS, 1948), die Herstellung und Verabreichung einer Eigenserumvakzine (MÜLLER und WILLE, 1953; KRAL und NICHOLS, 1959) sowie die intravenöse Behandlung mit den Enzymen Streptokinase und Streptodornase (SCHEIDY, KRAL und RAKER, 1954) versucht. Heute ist eine hochdosierte Antibiotika-Behandlung (EIKMEIER, 1970) in Verbindung mit chirurgischen Maßnahmen (BLAKELY, 1952) und Vitamingabe neben optimaler Ernährung die übliche Methode zur Therapie hartnäckiger Pyodermiefälle. Die Vielzahl der auch heute noch verwandten Maßnahmen zeigt aber, daß eine sichere und erfolgreiche Behandlung der schweren Staphylokokkenkrankungen des Hundes nicht existiert.

Ein neuer Weg zur Bekämpfung der Staphylokokkeninfektionen wäre die Herstellung einer Vakzine, mit der man den Hund prophylaktisch oder therapeutisch bei Krankheitsausbruch wirksam schützen könnte. Um den Erfolg einer solchen Vakzine zu garantieren, müßte die genaue Kenntnis der entscheidenden Pathogenitätsfaktoren der vorliegenden Staphylokokkenstämme greifbar sein. Auch dürfte eine solche Vakzine nicht nur stammesspezifisch sein, sondern sie müßte gegen alle für den Hund pathogenen Staphylokokkenstämme wirken.

Neben den verschiedenen Pathogenitätsfaktoren der Staphylokokken könnte das Panton-Valentine-Leukozidin (PANTON und VALENTINE, 1932; WRIGHT, 1936) als Exotoxin eine Rolle spielen. Die Wirkung dieses Toxins als Krankheitsfaktor wurde bereits 1894 von VAN DE VELDE beschrieben. Später untersuchten andere Forscher die pathologisch-anatomischen Folgen intravenöser Toxineinspritzungen beim Hund (VON GLAHN und WELD, 1935; RIGDON, 1936). Da ein Zusammenhang zwischen der PVL-Bildung von Staphylokokkenstämmen und ihrer Pathogenität beim Menschen und bei verschiedenen Laboratoriumstieren nachweislich besteht, mußte die Bildung von PVL bei klinisch pathogenen Staphylokokkenstämmen des Hundes überprüft werden (BÄNFFER, 1962;

JOHANOVSKY, 1957; LACK und TOWERS, 1962; STEIN, 1966).

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die aus eitrigen Hauterkrankungen des Hundes isolierten Staphylokokkenstämme PV-Leukozidin bilden. Die nähere Charakterisierung der Eigenschaften dieses Toxins in Verbindung mit Versuchen zur Reinigung erweiterten die gestellte Aufgabe.

II. LITERATURÜBERSICHT

A. Entdeckung leukozider Substanzen

Im Jahre 1894 beobachtete VAN DE VELDE, daß nach einer Injektion von virulenten Staphylokokken in die Pleurahöhle von Kaninchen die anschließend gewonnene Pleuraflüssigkeit eine zerstörende Wirkung auf Kaninchenleukozyten hatte. Diese leukozide Substanz konnte auch in vitro von Staphylococcus aureus-Bouillonkulturen gewonnen werden. Er nannte dieses Toxin "substance leucocide" oder "leucocidine". Es schien hitzelabil und antigen zu sein (DENYS und VAN DE VELDE, 1895): intravenöse Injektionen mit steigender Dosis des Toxins in Kaninchen führte zur Bildung von neutralisierenden Antikörpern. Dabei stellte sich heraus, daß die weißen Blutzellen des Kaninchens sehr empfindliche Indikatoren für die Wirkung zytotoxischer Substanzen waren. BAIL (1898) und VON LINGELSHEIM (1900) wiesen ebenfalls die leukozide Aktivität von Staphylokokkentoxinen nach: die Zugabe von Staphylokokkenkulturfiltrat zu einer aufgeschwemmten Leukozytensuspension rief innerhalb von 2 Minuten charakteristische morphologische Veränderungen an den Zellen hervor. Durch zunehmende blasige Abrundung, Kernverlust und periphere Anordnung der Granula an der Zellmembrannenseite demonstrierte sich der Zelltod. Die vorliegenden Zellveränderungen nutzten NEISSER und WECHSBERG (1900) zum Ausbau ihrer "bioskopischen Methode": sie titrierten die leukozide Aktivität von Staphylokokkenfiltraten, indem die Atemhemmung bei polymorphkernigen Leukozyten durch die Reduktion von Methylenblau unter teilweise anaeroben Bedingungen nachgewiesen wurde. Eine Erklärung dieser Tatsachen wurde durch die Beobachtungen erschwert, daß nicht nur weiße, sondern auch rote Blutzellen der Versuchstiere unterschiedlich stark und nach verschieden langer Einwirkungsdauer geschädigt wurden. Im Gegensatz zu der hämolytischen ging die leukozide Wirkung durch längere Lagerung verloren, so daß also die tödliche Wirkung auf die Leukozyten

früher einsetzen mußte als die hämolytische auf die Erythrozyten. Diese Ergebnisse führten NEISSER und WECHSBERG (1900) und später auch TAMAKI (1928) zu der Überzeugung, daß verschiedene Toxine vorliegen mußten. JULIANELLE (1922) unterschied als erster zwischen leukozider und hämolytischer Aktivität unterschiedlicher Staphylokokkentoxine. WELD und GUNTHER (1931) adsorbierten das Toxin bei 37°C an das Stroma von Erythrozyten und fanden einen Wirkungsverlust der leukoziden Substanz. Diese Beobachtungen von JULIANELLE wurden von PANTON und VALENTINE (1932) bestätigt. WRIGHT (1936) benannte später das Staphylokokkentoxin mit der leukoziden Wirkung "Panton-Valentine-Leukozidin". Durch die weitere Erforschung einer großen Anzahl von Staphylokokkenstämmen stellte er fest, daß die Wirkung des alpha-Hämolysins derjenigen des sogenannten "Neisser-Wechsberg-Leukozidins" parallel lief. Er schloß daraus, daß es sich bei dieser Substanz um einen Effekt des alpha-Hämolysins handeln mußte, der durch die unterschiedlichen Indikatoren verschiedener Forscher hervorgerufen worden war. In neueren Arbeiten wurde verlangt, daß die spezifisch leukozide, alpha-, beta- und delta-hämolytische Wirkung von Staphylokokkentoxinen verschiedenen Substanzen zugeordnet werden mußte (PROOM, 1937; VALENTINE und BUTLER, 1939; GLADSTONE und VAN HEYNINGEN, 1957). Bis heute sind 3 dieser Substanzen gereinigt worden (WOODIN, 1960; YOSHIDA, 1963; BERNHEIMER, 1965). Eine weitere leukozide Substanz der Staphylokokken wurde von JACKSON und LITTLE (1956) beschrieben. GLADSTONE und VAN HEYNINGEN nannten dieses Toxin 1957 "Leukolysin", da es die vollständige Auflösung polymorphkerniger Leukozyten bei verschiedenen Versuchstieren bewirkte.

Bis heute liegen also 3 leukozide Toxine der Staphylokokken vor: das "Panton-Valentine-Leukozidin" mit seiner zerstörenden Wirkung auf menschliche Leukozyten (PANTON und VALENTINE, 1932; WRIGHT, 1936), das "Neisser-Wechsberg-Leukozidin" als Bezeichnung für die

leukozyde Wirkung des alpha-Hämolysins (NEISSER und WECHSBERG, 1901; WRIGHT, 1936) und schließlich das "Leukolysin", welches die leukozyde Wirkungskomponente des delta-Hämolysins auf die Granulozyten verschiedener Spezies darstellt (GLADSTONE und VAN HEYNINGEN, 1957). Da nun das "Panton-Valentine-Leukozidin" als einziges Staphylokokken-Leukozidin nur weiße Blutzellen zerstörte, wurde es von VALENTINE (1936) das "wahre Leukozidin" genannt.

B. Wirkungsweise des Panton-Valentine-Leukozidins

Das Panton-Valentine-Leukozidin (PVL) wirkte auf Granulozyten und Makrophagen von Mensch und Kaninchen (GLADSTONE und VAN HEYNINGEN, 1957; WOODIN, 1959; GLADSTONE, 1966). Granulozyten der Maus, des Schafes und des Meerschweinchens waren nur geringgradig oder gar nicht empfänglich (GLADSTONE und VAN HEYNINGEN, 1957; WENK, 1969). VAN DE VELDE (1894) konnte mit Leukozidin aus Kulturfiltraten von Staphylokokken vom Menschen an Leukozyten vom Hund keine Veränderungen feststellen. Gelegentlich wurde beim Kaninchen ein Abfall der Lymphozyten (SZMIGLIELSKY et al., 1965) und bei Ratten ein Anstieg der Zahl der Mastzellen mit zunehmender Degranulation beobachtet (KWARECKI et al., 1968). Die ersten Untersucher arbeiteten ausschließlich mit Leukozidin von Staphylokokken vom Menschen. GLADSTONE und VAN HEYNINGEN, (1957) untersuchten Staphylokokkenstämmen tierischer Herkunft. Leider gaben sie nicht an, von welchen Tieren diese Stämme isoliert worden waren. WENK (1969) bearbeitete 120 Rinder- und 52 Hundestaphylokokkenkulturen, wobei er nur an koagulase-positiven Kulturen das PVL nachweisen konnte. Von den koagulase-positiven Kulturen vom Hund bildeten 38% ebenfalls PVL, es wirkte dabei weniger häufig auf Menschen- als auf Hundeleukozyten. SOBOLL (1971) untersuchte 118 Staphylokokkenkulturen von Kühen mit Mastitis. Davon bildeten 79% PVL, das auf Rinder- und Menschenleukozyten wirksam war. Ein Zusammenhang zwischen der PVL-Wirkung auf Rinder- bzw. Menschenleukozyten und der Zugehörigkeit der Staphylokokken zur

Variatio bovis bzw. hominis konnte aber nicht festgestellt werden.

Erythrozyten wurden vom PVL nicht sichtbar beschädigt oder hämolytisiert (VALENTINE, 1936; WRIGHT, 1936; GLADSTONE und VAN HEYNINGEN, 1957). Nach WOODIN (1959) wirkte das PVL auch auf Makrophagen vom Kaninchen, welche somit zum Nachweis benutzt werden konnten. VAN DE VELDE (1894) beobachtete eine schädigende Wirkung auf Hämatoblasten und Ganglienzellen des Sympathikus.

Zur direkten mikroskopischen Beobachtung der morphologischen Veränderungen versetzten VAN DE VELDE (1894), BALL (1898), VON LINGELSHEIM (1900) und PANTON und VALENTINE (1932) eine aufgeschwemmte Leukozytensuspension mit dem grob gereinigten Filtrat einer Staphylokokkenkultur. Die Einzelheiten während der Dauer der Zellveränderungen konnten aber im Lichtmikroskop nicht hinreichend beobachtet werden. Deshalb führten GLADSTONE und VAN HEYNINGEN (1957) das Phasenkontrast- und Dunkelfeldverfahren ein, durch welches selbst feinste Veränderungen der Zellmembran sichtbar wurden. In neuester Zeit untersuchte man mit dem Elektronenmikroskop die PVL-beschickte Zelle, um die lichtoptisch nicht mehr erfassbaren Veränderungen zu beschreiben (WOODIN, 1970). Auf Grund dieser Untersuchungen forderte WOODIN 1970, daß viele der unter dem Lichtmikroskop sichtbaren Veränderungen nicht von morphologischen Zustandsänderungen abstammen könnten, sondern durch einen Wechsel im Lichtbrechungsindex des Plasmas verursacht würden. Dieser konnte ganz beträchtlich sein, da die mit Leukozidin behandelte Zelle stark anschwellen konnte.

Heute werden mit biochemischen Methoden die chemischen Vorgänge als Grundlage der morphologischen Veränderungen erforscht (WOODIN, 1970).

Die schon von VAN DE VELDE (1894) beschriebenen Granulozytenveränderungen als Folge der Leukozidineinwirkung wurden in neuerer Zeit von GLADSTONE und VAN HEYNINGEN ausführlich beschrieben. Sie benutzten Menschenleukozyten und schilderten die ablaufenden Vorgänge

folgendermaßen: nach wenigen Minuten verlor die Zelle ihre Beweglichkeit, was sich durch Einziehen der Pseudopodien und Abrundung des Zelleibes dokumentierte. Die Granula zeigten ungeordnete Brown'sche Molekularbewegung und legten sich immer mehr als peripherer Saum der Innenseite der Zellwand an. Blasige Ausbeulungen des Zytoplasmas schnürten sich ab und wurden plötzlich ausgestoßen. Der Zellkern war abgerundet, seine Lappung verlorengegangen. Er lag deutlich sichtbar im Zellinneren. Nach längerer Einwirkungsdauer verschwand er vollständig, so daß die Zelle als leere Blase im griesigen randständigen Granula zurückblieb.

C. Biochemische Veränderungen der mit PVL behandelten Zelle

Auf Grund seiner biochemischen Studien stellte WOODIN (1970) eine Hypothese über die chemischen Veränderungen auf, welche durch die beiden Leukozidinkomponenten an der betroffenen Zelle verursacht werden konnten. In einem relativ aufwendigen Reinigungsvorgang war es ihm 1959 und 1960 gelungen, daß PVL rein darzustellen: durch fraktionierte Fällung mit absteigender Ammoniumsulfatlösungskonzentration, Fraktionierung durch wiederholte Chromatographie auf Hydroxylapatit, Konzentrierung durch Chromatographie auf einer Carboxymethylzellulose-Säule (CM) und anschließender Fraktionierung auf CM trennte er das PVL in eine schnell (=fast) laufende F-Komponente mit dem Molekulargewicht 32.000 von einer langsam (=slow) laufenden S-Komponente des Molekulargewichtes 38.000 ab. Diese beiden Fraktionen wurden durch Chromatographie auf Dowex-2 (x 8) und anschließend Amberlite CG-50 von Verunreinigungen gesäubert. Durch Aus-salzen ließen sie sich kristallin darstellen. Diese beiden Komponenten wirkten nur gemeinsam in charakteristischer Form, wobei eine Potenzierung des Wirksamkeitseffektes stattfand. Sie griffen an der Zelloberfläche an und bewirkten dort eine spezifische Permeabilitätsänderung der Zellmembran. Der Anknüpfungspunkt war wahrscheinlich die

Inositol-Triphosphat-Hälfte des Triphosphoinositid-Moleküls. Es entstand ein für Elektrolyte durchgängiger Kanal, durch den K^+ -Ionen aus- und Na^+ -Ionen in die Zelle einströmen konnten. Dieser Vorgang erinnerte an die Veränderungen in nervösen und sekretorischen Zellen nach Membrandepolarisation oder hormoneller Stimulation.

Des weiteren fand eine erhöhte Proteinsekretion für zytoplasmatische Zellproteine statt. Die mit PVL in Berührung gekommene Zelle schien für diese Proteine nicht durchgängig zu sein, so daß sie sich im Zellinneren anhäuften, was eine Aufquellung der Zelle bewirkte. Kalziumansammlung, eine Stimulation der ATPase und ein angeregter Orthophosphat-Nukleotid-Austausch vervollständigte die PVL-Wirkungen. Wie schon angedeutet, war eine auf Ionen beschränkte erhöhte Oberflächenpermeabilität für erregbares Gewebe während der Dauer der Membrandepolarisation charakteristisch. In einigen Fällen war diese mit einer ansteigenden Rate des Kalzium-Ionenaustausches zwischen Gewebe und umgebender Gewebsflüssigkeit verbunden (DOUGLAS und POISNER, 1962). In der lebenden ungeschädigten Zelle waren diese Vorgänge nun reversibel und von einer Zunahme der Zellatmung begleitet. Die mit PVL-behandelte Zelle steigerte ihre Atemkapazität nach der Leukozidineinwirkung nicht. Der Ionenaustausch war bei ihr auch irreversibel.

Aus diesen Gründen könnte man die mit Leukozidin in Berührung gekommene weiße Blutzelle als andauernd depolarisierte, losgelöste und potentiell sezernierende Zelle ansehen. Ihr Untergang könnte durch die Erschöpfung ihrer Leistungsreserven während der Zeit der Dauerdepolarisation, ihr Zerplatzen schließlich durch die große Menge des in ihrem Lumen angesammelten Zellproteins, welches nicht genügend eliminiert werden konnte, erklärt werden.

D. Nachweis der PVL-Wirkung

Zum Nachweis des leukoziden Effektes des PVL bedienten sich die ver-

schiedenen Forscher grundsätzlich des direkten und des indirekten Nachweises der PVL-Wirkung.

Bei der direkten Methode arbeitete VAN DE VELDE (1894) mit Granulozyten aus dem Pleuraexsudat von Kaninchen, die mit abgetöteten Staphylokokken vom Menschen beimpft worden waren. Dabei lagen die Testzellen als Suspension in der Exsudatflüssigkeit vor. Die Veränderungen der Zelle wurden lichtmikroskopisch beobachtet. PANTON und VALENTINE (1932) sowie JOHANOVSKY (1957) benutzten Menschenleukozyten, die aus dem venösen Blut durch Zentrifugieren und Waschen gewonnen worden waren. Dabei lagen die Testzellen mit den übrigen Blutzellen als Suspension in NaCl- oder Tyrode-Lösung vor. GLADSTONE und VAN HEYNINGEN (1957) führten die vereinfachte Methodik der Objektträgeradhäsion ein. Sie gewannen Menschenleukozyten aus Venenblut, tropften dieses auf vorgereinigte Objektträger, ließen das Blut im Brutschrank koagulieren und spülten anschließend das Koagulum mit einer Pufferlösung ab. Die so isolierten Granulozyten hafteten fest am Glas des Objektträgers und konnten nun mit PVL-Kulturflüssigkeit versetzt werden. Diese Methode war für den Routinebetrieb am besten, da sie einfach und schnell anzuwenden war. Die Zellveränderungen konnten im Phasenkontrast- oder Dunkelfeldmikroskop beobachtet werden.

Die indirekte Methode basierte auf der Tatsache, daß lebende Zellen einen Redox-Indikator-Farbstoff aufnehmen und infolge ihres stoffwechselbedingten Sauerstoffverbrauches zu einer farblosen Verbindung reduziert wurden. Dabei blieben die lebenden Zellen farblos und beweglich, während die toten Zellen angefärbt waren und unbeweglich fixiert erschienen. Diese "bioskopische Methode" stammte von NEISER und WECHSBERG (1901). Dabei benutzten diese Autoren und später auch JULIANELLE (1922), GROSS (1931), WELD und GUNTHER (1931), WRIGHT (1936) und PROOM (1937) Methylenblau als Indikator-

farbstoff. Später verwandten JENSEN und MALØE (1950) sowie WOODIN (1959) 2,6-Dichlorphenol-Indophenol als Indikator. JOHANOVSKY (1957) färbte die Zellen mit Nilblau und Kongorot, wobei die toten Zellen rostbraun und die lebenden Zellen hellblau erschienen. Als Testzellen dienten die Granulozyten von Kaninchen, die nach einer Injektion von Aleuronataufschwemmung in die Leibeshöhle (NEISSER und WECHSBERG, 1901) bzw. als Suspension in der Exsudatflüssigkeit der Pleurahöhle vom Meerschweinchen vorlagen (JULIANELLE, 1922). JENSEN und MALØE (1950) injizierten physiologische Kochsalzlösung in das Peritoneum von Kaninchen und gewannen die Granulozyten als Suspension in phosphatgepufferter 0,14 M NaCl-Lösung. WOODIN (1959) injizierte Paraffinum liquidum in die Peritonealhöhle seiner Kaninchen und präparierte Makrophagen aus der Peritonealhöhle als Suspension in Gelatine-Phosphat-Puffer.

Zum Test der PVL-Wirkung erwies sich die von GLADSTONE und VAN HEYNINGEN beschriebene Objektträgeradhäsionsmethode am vorteilhaftesten. Aber nicht jede verfügbare Blutart eignet sich dafür. So beschrieb WENK (1969) eine etwas abgeänderte Methode zur Gewinnung von Rinderleukozyten. Diese mußten erst nach dem Verfahren von BEHRENS und ESCH (1963) präpariert werden, ehe sie als erythrozytenfreie Suspension auf die Objektträger aufgetropft werden konnte.

E. Produktion von PVL

Eine Arbeitsanleitung zur Gewinnung von PVL wurde schon von VAN DE VELDE (1894) ausgearbeitet. Er beimpfte die Pleurahöhle von Kaninchen mit Staphylokokkenkulturen vom Menschen und fand anschließend im Exsudat die durch das Leukozidin zerstörten Granulozyten. PANTON und VALENTINE (1932) züchteten Staphylokokken auf halbflüssigen Agarmedien. Daran folgend wurde das ins Medium abgegebene PVL durch Filtration mit anschließender Zentrifugation gewonnen. JOHANOVSKY (1957) kultivierte die Staphylokokken auf Blutagarplatten, welche mit

Zellophan überschichtet waren. DENNIS (1933) packte Staphylokokken in Pergamentkapseln, verbrachte diese in das Peritoneum von Kaninchen und filtrierte die leukozide Substanz aus der Peritonealflüssigkeit. GLADSTONE und GLENCROSS (1966) schlossen Staphylokokken in Zellophansäckchen ein, welche sie dann in Kaninchen, Mäuse, Ratten und Meerschweinchen einpflanzten. All diese Methoden waren aber zur sauberen Gewinnung des Toxins und zur Herstellung größerer Mengen ungeeignet. Deshalb benutzten die meisten Forscher Bouillonkulturen der verschiedensten Zusammensetzungen, aus denen sie nach Anzüchtung durch Zentrifugieren und Filtrieren ein teilweise vorgereinigtes Kulturfiltrat mit leukozider Wirkung gewannen (BAIL, 1898; JULIANELLE, 1922; WELD und GUNTHER, 1931; GROSS, 1932; JENSEN und MALØE, 1950; WOODIN, 1959 - 1965; BÄNFFER, 1962; IMPERATO et al., 1966). Am ergiebigsten war nach GLADSTONE und VAN HEYNINGEN (1957) ein Casein-Casein-Yeast-Medium (CCY), das sogenannte "L-Medium" mit einer optimalen PVL-Ausbeute. Der CO_2 -Gehalt sollte unter 10% liegen, eine gute Belüftung mit O_2 war für die erfolgreiche Anzüchtung der Staphylokokken ausschlaggebend. Die Verwendung verschiedener Hefeextrakte brachte verschieden hohe PVL-Werte. Auch die Hefeextraktkonzentration hatte nach WENK (1969) einen entscheidenden Einfluß auf die PVL-Ausbeute. WENK (1969), KANOE et al. (1969 und 1971) sowie SOBOLL (1971) verwandten das LO_3 -Medium mit einer 1%igen Lösung eines Oxid-Hefeextraktes.

Zur PVL-Produktion arbeitete VALENTINE (1936) mit dem "humanen" Staphylokokkenstamm Wood 46. GLADSTONE und FILDES (1940), VALENTINE (1936), GLADSTONE und VAN HEYNINGEN (1957), BÄNFFER (1962), WOODIN (1970), KANOE et al. (1969), WENK (1969) und viele andere benutzten den Staphylokokkenstamm V_8 , der von einem Patienten mit chronischer Furunkulose (VALENTINE, 1936) stammte. SOBOLL (1971) isolierte PVL von dem "bovinen" Staphylokokkenstamm P_{83} , der von einer Kuh mit Mastitis gewonnen worden war.

F. PVL und seine Antikörper

Nach WOODIN wirkten die beiden PVL-Komponenten synergistisch. Jede Komponente für sich alleine war inaktiv, sie wurde erst durch Hinzufügen der anderen wirksam und sogar potenziert. Durch Titration der Antigenität mit überprüfbaren immunologischen Methoden konnte festgestellt werden, daß jede der beiden Komponenten eigene Antikörper induzierte (WOODIN, 1961; GLADSTONE et al., 1962). Somit schien die Antigenität des PVL bei Kaninchen (DENYS und VAN DE VELDE, 1895; NEISSER und WECHSBERG, 1901; GROSS, 1931; FLAUM, 1938) und bei Pferden (PANTON, VALENTINE und DIX, 1931; WRIGHT, 1936) gesichert zu sein. Während allerdings in frühen Arbeiten eine Unterscheidung in zwei PVL-Komponenten und deren Antikörper nicht vorgenommen werden konnte, bezogen sich die neueren Arbeiten auf Leukozidin von Staphylokokken vom Menschen unter der Berücksichtigung der Antigenität der F- und S-Komponente des PVL.

Auf Grund der immunologischen Forschungsergebnisse wurde überprüft, in wie weit ein Anti-PVL therapeutisch zur Prophylaxe oder Therapie bei akuten Staphylokokkeninfektionen zu gebrauchen war. JOHANOVSKY fand 1958, daß Versuchspersonen mit hohem Anti-PVL-Titer seltener an Staphylokokkeninfektionen erkrankten als andere mit niedrigem oder fehlendem Anti-PVL-Titer. BÄNFFER (1962) untersuchte den Zusammenhang zwischen Anti-PVL-Titerhöhe und dem Vorliegen einer Staphylokokkeninfektion bei der Mastitis der Frau. Er fand eine negative Korrelation. Die Immunisierung schwangerer Frauen (BÄNFFER, 1962) mit einem vorgereinigten PVL-Toxoid ergab, daß die immunisierten Patientinnen seltener an Mastitis erkrankten. VIDAL (1968) immunisierte Ziegen mit einem PVL-Toxoid. Vergleichsgruppen erhielten alpha- bzw. beta-Hämolysine. Nach intramammaler Infektion der Versuchstiere mit pathogenen Staphylokokken verglich er die Häufigkeit und Schwere der aufgetretenen Mastitiden: die mit Anti-PVL-Toxoid immunisierten Tiere

erkrankten auffallend weniger häufig als die mit Anti- alpha- bzw. Anti-beta-Hämolysin vorbehandelten Tiere. STEIN (1966) stellte mit Kaninchen ähnliche Versuche an. Er immunisierte eine Gruppe der Versuchstiere mit einem PVL-Toxoid, eine andere mit alpha- und eine dritte mit PVL- und alpha-Hämolysin-Toxoiden. Dabei stellte er fest, daß nur die gegen PVL- und alpha-Hämolysin immunisierten Tiere einer anschließenden massiven Infektion mit pathogenen Staphylokokken widerstanden.

G. Die PVL-Bedeutung bei der Staphylokokkenpathogenität

PANTON und VALENTINE (1932) stellten die Hypothese auf, daß eine Beziehung zwischen der in vivo produzierten PVL-Menge und der Pathogenität der vorliegenden Staphylokokken vorhanden sein müsse. JOHANOVSKY (1958) fand eine negative Beziehung zwischen der Staphylokokkeninfektion und einem dabei vorliegenden Anti-PVL-Titer bei seinen Patientinnen. GLADSTONE et al. (1962) vermuteten, daß die Antitoxinproduktion der wichtigste Faktor bei der Abwehr von Staphylokokkeninfektionen sein müsse. Aus dem prozentualen Anteil der PVL- und der alpha-Hämolysin-Antikörper bei ihren menschlichen Patienten schlossen sie, daß ein Anstieg des PVL-Antikörper-Titers, nicht aber ein Anstieg des alpha-Hämolysin-Antikörper-Titers, jede Infektion zu begleiten schien. MUDD et al. (1962) konnten mit Staphylokokken-Toxoiden die Bildung von Antikörpern gegen PVL bei ihren Patienten nicht erreichen. In den folgenden Jahren beschrieb GLADSTONE (1965) eine Methode zur PVL-Toxoid Herstellung, durch die bei Kaninchen (SOUCKOVA-STEPANOVA et al., 1965) als auch mit menschlichen Patienten (MUDD et al., 1965) eine hohe PVL-Antikörperproduktion angeregt werden konnte. Es stellte sich heraus, daß pathogene Staphylokokkenstämme in vivo PVL produzierten, und daß der PVL-Antikörper-Titer zur Diagnose versteckter Infektionsherde benutzt werden konnte. Eine prophylaktische Wirkung durch PVL-Antikörper konnte jedoch nicht erzielt werden (TOWERS und GLADSTONE, 1958). SOUCKOVA-

STEPANOVA et al. (1965) immunisierten Kaninchen mit einem Toxoid, welches zu mehr als 50% aus PVL bestand. Sie beobachteten zwar einen erhöhten Schutz gegen nachfolgende Infektionen, sie fanden aber zwischen der Schutzwirkung und dem PVL-Titer keine direkte Beziehung.

Wenn nun bakterielle Exotoxine wie z.B. das PVL oder die Hämolytine die Überlebensfähigkeit der Staphylokokken erhöhen sollten, so sollte man bei dieser Feststellung nicht außer Acht lassen, daß der infizierte Körper immer auch durch die Abnahme seiner Phagozytenmenge geschwächt ist und den eingedrungenen Staphylokokken nicht energisch genug entgegentreten könnte. Die Menge der eingedrungenen Staphylokokken würde dann hauptsächlich durch die im Blut zirkulierenden Antikörper in Schach gehalten werden können. Dabei fanden ROGERS und TOMPSETT (1952) bei ihren Versuchen heraus, daß pathogene Staphylokokken die Phagozytose überleben konnten, während nichtpathogene Stämme sehr rasch durch die Phagozyten zerstört wurden. Pathogene Staphylokokken schienen durch ihre Exotoxine in der Lage zu sein, leichter in gesunde weiße Blutzellen einzudringen. Dadurch wurden sie gut gegen die Aufnahme und Tötung durch die Phagozyten geschützt. Weiterhin konnten sie auf diese Art auch den sie im allgemeinen zerstörenden Antikörpern und Antibiotika entgehen. Versuche ergaben, daß Kaninchen mit einer durch Stickstofflost induzierten Granulozytopenie eingepflichte pathogene Staphylokokken schneller eliminieren konnten, als dies bei Vergleichstieren mit intaktem Blutbild der Fall war.

III. MATERIAL UND METHODEN

A. Staphylokokkenkulturen

Als Untersuchungsmaterial dienten 243 Staphylokokkenkulturen vom Hund. Sie wurden von Patienten der Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik I aus eitrigen Hauterkrankungen isoliert und im Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Justus Liebig-Universität zu Gießen kultiviert und eingeordnet.

Zur weiteren Anzüchtung der Kulturen wurden Blutagarplatten benutzt. Dem Grundmedium Bacto Blood Agar Base ⁽¹⁾, konnte nach Abkühlung auf 52°C defibriniertes und steriles Schafblut im Verhältnis 9 : 1 zugegeben werden.

Zum Aufbewahren der Kulturen eignete sich ein in Reagenzgläser ausgegossener Schrägagar. Er wurde aus Bacto Blood Agar Base ⁽¹⁾ hergestellt, dem 0,5% Agar ⁽²⁾ zugesetzt wurden.

Die Einordnung der Staphylokokkenkulturen in die Art S. aureus erfolgte durch den Nachweis der Koagulasebildung und der Mannitvergärung.

Die Koagulase - Bildung wurde im Röhrchentest nach einer modifizierten Methode von MEYER (1966) untersucht. Dazu wurde einem Kaninchen 0,8 ml Nativblut aus der Ohrvene entnommen und mit 0,2 ml einer 3,8%igen Natriumzitratlösung versetzt. Das Zitratblut wurde dann bei 200 x g ⁽³⁾ zentrifugiert, anschließend das Plasma abpipettiert und mit 0,14 M NaCl-Lösung im Verhältnis 1 : 5 verdünnt. 0,5 ml dieser Plasmalösung wurden mit 0,5 ml einer vorher 17 Std. bei 37°C

(1) Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

(2) Riedel-de Haen AG, Seelze, Hannover

(3) Zentrifuge der Fa. W. Stock-Maschinenbau KG, Marburg

bebrüteten Staphylokokken- LO_3 -Bouillonkultur versetzt und 3 Std. bei 37°C bebrütet. Nach dieser Zeit erfolgte die Ablesung des ersten, nach weiteren 18 Std. bei Zimmertemperatur die des zweiten Wertes.

Hundeblut für den Koagulasetest konnte Versuchstieren der Chirurgischen Veterinärklinik aus der Vena jugularis entnommen werden. Das Plasma wurde in gleicher Weise wie beim Kaninchen zubereitet und unverdünnt weiterverwendet. Als positive Koagulasereaktion galt in allen Fällen die Gerinnung des Plasmas, wobei je nach Gerinnungsgrad von $\emptyset$ bis +++ beurteilt wurde.

Der Nachweis der Mannitvergärung erfolgte auf Mannit-Bromthymolblau-Agarplatten nach ELEK (1950) unter anaeroben Bedingungen.

Die Zuordnung der Kulturen zu den verschiedenen Speziesvarianten erfolgte im Kristallviolett - Test nach MEYER (1967). Dabei wurde nach dem folgenden Schlüssel beurteilt:

Wachstum	Kristallviolettgruppe
Orangegelb bis gelb mit violettem Rand	A = Rind
Violett bis blaviolett	C = Mensch
Weiß bis blauweiß	E = Hund

B. Blut zur Leukozytenisolierung

Als Testzellen zum Nachweis der leukoziden Wirkung des PVL wurden Granulozyten von Mensch, Rind, Hund, Schaf, Pferd, Kaninchen und Meerschweinchen verwandt. Das Menschenblut stammte aus der Medizinischen Poliklinik der Medizinischen Fakultät, alle übrigen Blutarten aus verschiedenen Instituten und Kliniken der Veterinärmedizinischen Fakultät der Liebig-Universität.

C. Leukozytenisolierung

Zur Isolierung lebender Granulozyten wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Methoden verwendet.

1. Objektträgeradhäsion

Lebende Granulozyten von Mensch, Kaninchen und Meerschweinchen konnten nach der Methode von GLADSTONE und VAN HEYNINGEN (1957) isoliert werden. Zu diesem Zweck wurden Glasobjektträger der Größe 7,5 x 5,0 cm gründlich gereinigt. Auf diese konnte dann bei 150°C in einer Std. eine gleichgroße Parafilmschicht ⁽¹⁾ mit 10 ausgestanzten runden Löchern aufgeschmolzen werden. In jedes Loch dieses Parafilmobjektträgers (PO) wurde 1 Tropfen frisches Nativblut gegeben und 1 2 Std. bei 37°C in einer feuchten Kammer bebrütet. Nach der Gerinnung der Bluttröpfchen waren die Granulozyten auf Grund ihrer amöboiden Bewegung ausgewandert. Sie hafteten nun fest an der Glasoberfläche und waren 2 - 4 Std. für den PVL-Test verwendbar. Das Blutkoagulum wurde anschließend mit PBS-Puffer aus einer Spritzflasche abgespült. In jedes Loch wurden nun 0,02 ml der jeweiligen Verdünnungsstufe einer zweifachen Verdünnungsreihe des PVL-Kulturfiltrates zugegeben. Nach Bebrütung für 1 Std. bei 37°C konnte die eingetretene Veränderung unter dem Mikroskop beobachtet werden. Dazu wurde ein dünnes Deckglaschen über die Präparation gelegt und im Phasenkontrastlicht bei 320-facher Vergrößerung mit einem ZEISS-Objektiv ⁽²⁾ beobachtet.

2. Hämolyse mit destilliertem Wasser

Die oben beschriebene, relativ einfache Methode konnte bei Rinder-, Schaf- und Pferdeleukozyten nicht verwandt werden. Vielmehr mußte vorher nach der Methode von BEHRENS und ESCH (1963) die hämolytische

(1) Parafilm "M", American Can Company, Neenah, USA

(2) Neofluar 40/0, 75, Carl Zeiss, Oberkochen

Zerstörung der Erythrozyten durch destilliertes Wasser erreicht werden, bevor die Granulozyten durch Zentrifugieren gewonnen werden konnten.

Zu diesem Zweck wurde frisches Nativblut mit 3,8%iger Natriumzitratlösung im Verhältnis 4 : 1 ungerinnbar gemacht. Unter ständigem Rühren gab man dann die doppelte Menge destillierten Wassers hinzu und ließ Rinderblut 55 Sek., Schaf- und Pferdeblut 65 Sek. lang hämolysieren. Die Hämolysezeit mußte mit einer Stoppuhr überwacht werden. Anschließend wurde mit 4,5%iger NaCl-Lösung in der 1/2 Menge des ursprünglichen Natriumzitratblutes isotonisch gemacht. Aus dem so hämolysierten Blut konnten die Granulozyten durch Zentrifugieren bei 100 x g für 10 Min. gewonnen und 3 x in PBS-Puffer gewaschen werden. Diese Suspension wurde mit einer 0,02 ml Mikropipette ⁽¹⁾ in einer Zellkonzentration von 10^4 /ml auf die Felder der PO aufgetropft. Anschließend wurde wie oben beschrieben verfahren. Die Granulozyten blieben in einer Zelldichte von 500 - 1000 Zellen/PO-Feld haften. Die Erythrozyten und anderen weißen Blutzellen waren fast vollständig verschwunden.

3. Hämolysen mit Ammoniumchlorid

Die Isolierung der Hundeleukozyten gelang in der von WENK (1969) nach BEHRENS und ESCH (1963) modifizierten Weise bei eigenen Versuchen nicht. Es stellte sich heraus, daß Hundeerythrozyten die Hämolysen mit destilliertem Wasser länger als 10 Min. überdauerten, was schon HEITMANN et al. (1969) festgestellt hatten. In dieser Zeit waren aber fast alle Granulozyten zerstört. Weiterhin ließ sich das Nativblut vom Hund nicht in der beschriebenen Weise auf PO tropfen, da die Granulozyten nicht auf die Glasfläche auswanderten, sondern an der

(1) Mikropipette Marburg, Eppendorf Gerätebau, Netheler, Hamburg

Oberfläche des halbkugeligen Blutropfens im Schwebezustand verblieben. Bei den nachfolgenden Versuchen wurde untersucht, ob der Zusatz senkungsbeschleunigender Stoffe zum Vollblut mit anschließender Isolierung der Leukozyten aus dem überstehenden Plasma eine befriedigende Granulozytenausbeute bringen würde.

Die einfache Blutsenkung in speziellen Glasröhrchen brachte keinen Erfolg, da nach REMMELE und BRÜCKEL (1955) durch die lange Sedimentationszeit infolge der O_2 -Mangelversorgung an den Leukozyten irreversible Schäden entstanden, was die Zellen für weitere Untersuchungen untauglich machte.

Zur Erhöhung der Blutkörperchen-Senkungs-Geschwindigkeit (BSG) mit dem Ziel einer beschleunigten Leukozytengewinnung und geringerer Stoffwechselschädigung durch O_2 -Verlust wurde die Wirkung folgender Stoffe untersucht: Fibrinogen (STARLINGER, 1922; BUCKLEY et al. 1950), Polyvinylpyrrolidon (PVP) (BRAUNSTEINER et al., 1952), Dextran und Gammaglobuline (MINOR und BURNETT, 1952; TULLIS, 1952; PICKUP, 1949). Durch diese Substanzen wurde die Geldrollenbildung der Erythrozyten gefördert (ONCLEY et al., 1949), was eine schnellere Senkung bewirkte. Keine dieser Methoden befriedigte jedoch, da nach 1 - 2 stündiger BSG die Plasmaausbeute zu gering war, um die notwendigen PVL-Tests auszuführen.

Die Hämolyse der Erythrozyten unter möglichster Schonung der Leukozyten durch Wasser (BEHRENS und ESCH, 1963; THIMM, 1964) und Ammoniumchlorid (NAGEL, LAHANN und WEIHRAUCH, 1958; WEINHOLD 1965) brachte erst nach 10 Min. Hämolysezeit den gewünschten Erfolg. Dies bedeutete aber mit Sicherheit eine Leukozytenschädigung, so daß auch diese Methoden unbrauchbar schienen.

Schließlich wurde versucht, die Leukozyten durch Zentrifugieren des Blutes über einer Lösung von bestimmtem spezifischen Gewicht unbeschädigt zu gewinnen. Diese als "Flotation" bezeichnete Trennungsvor-

ren wurden bisher mit Rinderalbumin (KISSMEYER-NIELSEN und KJERBY, 1969), Gummi acacia (SPEAR, 1948), Ficoll (BØYUM, 1964; NOBLE, 1967), Isopaque (BØYUM, 1968) und Jodamid (OTTO und SCHMID, 1970) durchgeführt. In eigenen Versuchen wurde die Leukozytenisolierung nach Zusatz des hochmolekularen Polysaccharids Dextran ⁽¹⁾ durch Spontansedimentation mit anschließender Hämolyse durch Ammoniumchlorid versucht. Die Flotation zur Trennung der Granulozyten erfolgte über Jodamid. OTTO (1970) erprobte dieses Verfahren an Blut von Mensch, Schwein, Schaf, Pferd und Hund. Er fand nach Trypanblau-Vitalitätsfärbung weniger als 2% gefärbte, d.h. tote Zellen. Dieses Ergebnis konnte in eigenen Versuchen nicht erreicht werden. Vielmehr lagen 70 - 75% lebende und 30% tote, d.h. gefärbte Leukozyten vor. Außerdem war diese Präparation nicht von Erythrozyten frei.

In weiteren Versuchen wurde eine im humanmedizinischen Bereich häufig angewandte Methode zur Isolierung neutrophiler Granulozyten auf ihre Eignung für Hundeblut untersucht. Sie beruht auf der senkungsbeschleunigenden Wirkung des Haemaccels ⁽²⁾, einem Plasmaersatzmittel aus Gelatine mit dem Molekulargewicht 35.000, sowie der Suspensions-stabilisierenden Wirkung eines Mediums ⁽³⁾ nach PARKER (1950). Dieses Medium wurde schon lange zur Aufbewahrung von Zell- und Gewebekulturen verwandt. Durch diese Methode konnte die größte Granulozytenausbeute erzielt werden. Durch Trypanblau-Vitalfärbung ergaben sich weniger als 2% tote Zellen. Die Suspension war nahezu frei von Erythrozytenschatten und Lymphozyten. Dennoch war sie nicht anwendbar, da bei Verwendung der so hergestellten Granulozytensuspension bei keiner Verdünnungsstufe oder bei dem unverdünnten, vorge-

(1) Dextran T 250, Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden

(2) Behringwerk AG, Marburg

(3) TC Medium 199, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

reinigten PVL-Kulturfiltrat eine leukozide Wirkung mit den charakteristischen Erscheinungen an den Zellen zu beobachten war.

Zur Präparation der Hundeleukozyten für den PVL-Test wurde schließlich eine Methode erarbeitet, die auf den Erkenntnissen von WEINHOLD (1965) basierte. Die Erythrozyten waren dabei mit Hilfe einer 0,83%igen Ammoniumchlorid-Lösung hämolysiert worden und dann in einem Spezialmedium aufgeschwemmt worden. Im einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen:

Nativblut wurde im Verhältnis 9 : 1 mit Heparin ungerinnbar gemacht. Es war darauf zu achten, daß die Heparinkonzentration nicht über 200 mg% lag, da sonst Schäden an den Leukozyten auftraten (ROBERTS und ANDERSON, 1949; OTTO, 1970). Dann wurde mit der 10-fachen Menge einer 0,83%igen Ammoniumchlorid-Lösung 5 Min. hämolysiert. Auf eine gute Durchmischung der Lösung sowie Überwachung der Zeit mit einer Stoppuhr war zu achten. Nach der Hämolyse konnte die Lösung bei 50 x g 10 Min. zentrifugiert, der Überstand abgegossen, und der Bodensatz 3 x mit Eagle's Basal Medium und Earle's Salzen ⁽¹⁾ (=BME + EBSS) nach EAGLE (1955) und EARLE (1943) gewaschen werden. Eine gründliche Durchmischung war dabei erforderlich. Die so hergestellte Granulozytensuspension war 2 Std. für den PVL Test geeignet. Im TC Medium 199 konnte das Leukozytenkonzentrat bei Kühlagerung 4 Tage verwendet werden.

C. Gewinnung von PVL

Die Hundestaphylokokkenkulturen wurden auf Schafblutagar überimpft und 24 Std. bei 37°C angezüchtet. Anschließend wurde eine Öse voll Staphylokokken (-0,01 ml) in einen 100,0 ml Erlenmeyerkolben ⁽²⁾ mit 10,0 ml

(1) BME mit Earle's BSS mit Glutamin, Serva-Feinbiochemika, Heidelberg

(2) Jenaer Glas, Schott AG, Mainz

LO₃-Nährbouillon überimpft. Dieses Medium war nach GLADSTONE und VAN HEYNINGEN (1957), modifiziert von WENK (1969) hergestellt worden. Die so gewonnene Vorkultur mußte 10 Std. auf einer Schüttelmaschine bei 37°C bebrütet werden. Anschließend wurden zwei 100,0 ml Erlenmeyerkolben mit zusammen 20,0 ml LO₃-Medium in einen 2,0 l Kolben mit 180,0 ml LO₃-Medium umgeschüttet und 30 Std. auf der Schüttelmaschine bei 37°C bebrütet. Diese Lösung wurde nach dem Bebrüten bei 11.000 x g in 30 Min. klarzentrifugiert ⁽¹⁾. Der nun weitgehend bakterienfreie Überstand wurde gesammelt und durch Filter ⁽²⁾ gepresst. Das Filtrat konnte sofort weiterverarbeitet werden.

Zur Konzentrierung des PVL-Kulturüberstandes wurde 1 l in einen Dialyseschlauch ⁽³⁾ gefüllt und 24 Std. gegen 10 l gesättigte Ammoniumsulfatlösung (ASL) dialysiert. Dabei bildeten sich Präzipitate, die bei 15.000 x g in 30 Min. abzentrifugiert, in 20,0 ml PBS-Puffer gelöst und gegen 1 l PBS mehrere Tage dialysiert wurden.

Nach SARGEANT und ELSWORTH (1970) konnte zur PVL-Anreicherung auch die Proteinfällung mit 3 M ASL-durchgeführt werden. Dabei wurden 3 - 5 l Staphylokokken-LO₃-Bouillonkultur hergestellt. Die Proteine konnten durch Fällung gegen 1.200 g (bei 3 l Bouillon) oder 2.000 g (bei 5 l Bouillon) Ammoniumsulfat als Bodensatz angereichert werden. Anschließend erfolgte die Reinigung der Bouillon durch Filterpapier ⁽⁴⁾, wobei sich die Proteine als brauner Niederschlag im Filterpapier anreicherten. Der Proteingehalt des Filtrates wurde mit dem Folin-Phenolreagenz nach LOWRY (1951) bestimmt. Die photometrische Messung fand bei 750 nm

(1) Sorvall RC 2-B Automatic superspeed refrigerated Centrifuge, Ivan Sorvall Inc., Norwalk, Connecticut, USA

(2) Millipore-Filter, Porengröße 0,22 µ, Millipore, Neu-Isenburg

(3) Kalle AG, Wiesbaden-Biebrich

(4) Carl Schleicher + Schüll-Filter, Marke Selecta, Kassel

Tabelle 1

Methoden zur Isolierung lebender Granulozyten

Methoden	Mensch	Rind	Hund	Schaf	Pferd	Kanin.	Meersch.
Objektträgeradhäsion nach GLADSTONE und VAN HEYNINGEN (1)	+					+	+
Hämolyse mit Aq. dest. nach BEHRENS und ESCH und an- schließender Objektträgerad- häsion (2)		+		+	+		
Hämolyse mit $(\text{NH}_4)\text{Cl}$ nach WEINHOLD mit anschließender Herstellung eines Mono- layer-Zellrasens (3)			+				

(1) Brit. J. Exptl. Pathol. 38, 123 - 137 (1957)

(2) Experientia 19, 406 - 407 (1963)

(3) Berl. u. Münch. Tierärztl. Wschrft. 21, 406 - 408 (1965)

statt ⁽¹⁾. Da die Farbe im Filtrat bei der photometrischen Messung störte, mußten die Proteine vorher mit 10%iger Trichloressigsäure ausgefällt, abzentrifugiert und gewaschen werden. Zur Entfernung des noch vorhandenen Ammoniumsulfates wurde der Bodensatz in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und gegen destilliertes Wasser in einem Dialyseschlauch 24 Std. bei 4°C dialysiert. Eine Anreicherung fand anschließend durch Dialyse gegen Polyäthylenglykoll statt. Sie dauerte so lange, bis so viel Wasser entzogen worden war, daß die Flüssigkeit im Dialyseschlauch auf ca. 11,0 ml eingengt worden war.

D. PVL - Nachweis

Der Nachweis der leukoziden Wirkung des Kulturüberstandes erfolgte durch die mikroskopische Beobachtung der Zellveränderungen im Phasenkontrastmikroskop. Dabei wurden PO mit lebenden Granulozyten von Mensch (GLADSTONE et al. 1957), Rind (WENK, 1969; SOBOLL, 1971), Schaf, Pferd, Kaninchen und Meerschweinchen beschickt. Vom Kulturüberstand wurde mit PBS-Puffer eine zweifache Verdünnungsreihe hergestellt und mit 0,02 ml Granulozytensuspension zusammengegeben. Nach 1 Std. Bebrütung bei 37°C konnte das Präparat im Mikroskop auf die PVL-Wirkung hin untersucht werden.

Hundeleukozyten wurden nach der modifizierten Weinhold-Methode gewonnen. Da diese aber nicht auf einen PO getropft werden konnten (sie wanderten nicht aus und hafteten nicht am Glas), mußten sie auf eine andere Weise mit dem PVL-Präparat zusammengebracht werden. Zu diesem Zweck wurden 0,02 ml jeder Verdünnungsstufe in ein Reaktionsgefäß ⁽²⁾ eingefüllt und mit der gleichen Menge Leukozytensuspension beschickt. Der Kunststoffdeckel wurde fest verschlossen, das Gefäß in Spezial-Reagenz-

(1) Zeiss Spektralphotometer PMQ II, Carl Zeiss, Oberkochen

(2) Eppendorf-Reaktionsgefäße 200, Eppendorf Gerätebau, Hamburg

glasständer ⁽¹⁾ gestellt und bei 37°C 1 Std. bebrütet. Der dichte Verschluss des jeweiligen kleinen Gefäßes verhinderte eine Verdunstung der geringen Lösungsmenge von nur 0,04 ml im Brutschrank, und der konisch zugespitzte untere Teil des Gefäßes bewirkte ein Absinken der Granulozyten, so daß diese mit einer Mikripipette anschließend in angereicherter Form entnommen werden konnten. Zur nachfolgenden mikroskopischen Beobachtung wurden 0,005 ml entnommen und auf einen gründlich gesäuberten Objektträger aus Glas getropft. Dabei konnten 4 Tropfen in eine Reihe und 3 Reihen auf einem Objektträger aufgetropft werden, so daß insgesamt 12 Verdünnungsstufen in einem Arbeitsgang beobachtet werden konnten. Jeder Tropfen wurde mit einem Deckgläschen (1,0 x 1,0 cm) abgedeckt. Damit erhielt man einen Zellrasen aus nur einer Zellschicht, in dem jede Zelle unfixiert beobachtet werden konnte.

Zur Bewertung der PVL-Konzentration wurde die minimale leukozide Dosis (-MleD) angegeben. Dies war der Kehrwert der höchsten Verdünnungsstufe, die eben noch an allen Zellen des Präparates den Tod der Granulozyten mit charakteristischen Zellveränderungen verursachte (GLADSTONE und VAN HEYNINGEN, 1957).

E. Hämolysinnachweis

Zum Nachweis der vorhandenen Staphylokokkenhämolysine diente die Bestimmung der minimalen hämolytischen Dosis (-MHD). Das war der Kehrwert der höchsten Verdünnungsstufe, die eben noch eine vollständige Hämolyse der Erythrozyten hervorrief (GLADSTONE, 1966).

Zum Nachweis des alpha-Hämolysins wurde eine 0,5%ige Kaninchenerythrozytensuspension in steriler NaCl-Lösung verwandt. Beta-Hämolysin wurde mit einer 0,5%igen Schaferythrozyten- und delta-Hämolysin mit einer 0,5%igen Menschenerythrozytensuspension ermittelt. Jede Stufe

(1) in eigener Werkstatt hergestellt

einer 2-fachen Verdünnungsreihe mit 0,5 ml PBS wurde mit 0,5 ml der entsprechenden Erythrozytensuspension vermischt. Nach Bebrütung bei 37°C konnte in 1 Std. abgelesen werden. Zur Ermittlung des "cold"-Wertes des beta-Hämolysins mußten die Röhrchen anschließend 1 Std. bei 4°C aufbewahrt werden.

F. Wachstum und Toxinbildung

Das Wachstum der Staphylokokkenkulturen wurde photometrisch bei 620 nm⁽¹⁾ verfolgt. Die in bestimmten Zeitabständen gemessene Lichtabsorption diente als Maß für das Wachstum der Zellen in der Kultur. Parallel dazu wurde jeweils die PVL-, alpha-, beta- und delta-Hämolysinbildung untersucht.

An Toxinen und Enzymen wurden untersucht:

die Bildung von saurer und alkalischer Phosphatase mit einer von W. SCHAE⁽²⁾ entwickelten Farbindikatormethode;

die DNase-Aktivität auf dem DNase-Testagar nach JEFFRIES et al. (1957);

die Protease auf einem aus Nutrient Gelatin⁽³⁾ hergestellten Testagar;

Tributyrylase wurde auf Tributyrin-Agar⁽⁴⁾ nachgewiesen;

der Nachweis des Eigeibfaktors erfolgte auf Eigelbplattenmedium nach GILLESPIE und ALDER (1952);

die Fibrinolysin-Aktivität konnte auf Fibrinogen-Plattenmedium nach HENTSCHEL (1968) ermittelt werden;

zur Untersuchung der Hyaluronidase wurde Testagar nach SMITH und WILLETT (1968) verwendet;

(1) Spectronic 20, Bausch + Lomb, L.Hormuth, Heidelberg

(2) persönliche Mitteilung Dr.W.Schaeg, Institut für Bakteriologie und Immunologie der Justus Liebig-Universität zu Gießen

(3) Baltimore Biological Laboratory, Baltimore, USA

(4) Oxoid Ltd., London S.E. 1

das Penicillinasevorkommen konnte auf CY (=Casein Yeast)-Testagar nach NOVICK (1963) untersucht werden.

Zur Resistenzprüfung gegen antibiotische Präparate wurden Schafblut-agarplatten verwendet. Sie wurden mit einer in steriler physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmten Staphylokokken-Suspension beimpft. Anschließend wurde ein Antibiotika-Teststern ⁽¹⁾ auf die gleichmäßig ausgestrichene Suspension gedrückt und 24 Std. bei 37°C bebrütet. Die Resistenz der Staphylokokken gegen ein bestimmtes Antibiotikum dokumentierte sich durch Heranwachsen des Zellrasens bis an den Stern. Die Empfindlichkeit ließ sich durch einen hellroten Hof rings um den entsprechenden Sternzacken zeigen.

G. Reinigungsversuche

Zur PVL-Anreicherung und -Reinigung wurden 2 Methoden auf ihre Brauchbarkeit bei Hundestaphylokokken-Kulturen hin untersucht: die Ammoniumsulfat-Fällung nach SARGEANT und ELSWORTH (1970) mit anschließender Gelfiltration, und die PVL-Anreicherung mit Aluminiumoxid-Cholesterin nach KANOE et al. (1969 + 1971).

Bei der Ammoniumsulfat-Fällung wurden mehrere Liter eines zentrifugierten und filtrierten Kulturüberstandes mit soviel Ammoniumsulfat gemischt, daß eine 3 molare ASL entstand. Unter ständigem Rühren blieb diese Lösung bis zu vollständigen Auflösung des Ammoniumsulfates bei 4°C stehen. Das ausgefällte Protein sammelte sich als bräunlicher Schleier am Boden des Gefäßes. Durch Filtration dieses Kulturüberstandes und des Bodensatzes erhielt man ein Rohprotein, welches als brauner Bodensatz im Filterpapier vorlag. Dieses Protein wurde aus dem Filterpapier mit 20,0 ml einer 25%igen ASL (SOBOLL, 1971) ausgewaschen und bei 19.000 x g 30 Min. klarzentrifugiert. Dabei wur-

(1) Multodisk-Teststern. Oxoid Ltd., London

den die aggregierten und ausgefällten unlöslichen Proteine als Bodensatz verworfen. Der Überstand wurde zur Entfernung des Ammoniumsulfates gegen destilliertes Wasser und zur Einengung dieses Dialysates gegen gesättigte Polyäthylenglykoll-Lösung dialysiert. Zur Proteinbestimmung mit dem Folin-Phenolreagenz wurde 1,0 ml entnommen. Der Rest wurde auf eine Sephadex G 100 ⁽¹⁾-Chromatographiesäule ⁽²⁾ aufgetragen. Die Proteinmenge lag dann bei ca. 40,0 mg/ml. Zum Auftragen der Proteinlösung auf die Säule wurde eine peristaltische Pumpe ⁽³⁾ mit der Durchflußgeschwindigkeit von 4,5 ml/Std. verwandt. Die Auswaschung der Proteine erfolgte mit einer 25%igen ASL (SOBOLL, 1971), wobei das Eluat in 6,0 ml-Fractionen von einem Fraktionssammler ⁽⁴⁾ aufgefangen wurde. Die Extinktion der eluierten Flüssigkeit bestimmte automatisch ein Durchflußphotometer ⁽⁵⁾ bei 280 nm, wobei die Kurve durch einen angeschlossenen Einkanal-Zweifarbenschreiber ⁽⁶⁾ aufgezeichnet wurde. Sämtliche Fractionen wurden auf ihre PVL-, alpha-, beta und delta-Hämolysinwirkung sowie auf ihre Phosphatase, Gelatinase- und DNase-Aktivität untersucht. Bei Peaks mit hoher PVL-Aktivität wurde zusätzlich die Proteinmenge bestimmt.

Bei der Aluminiumoxid-Cholesterin-Anreicherungs-methode wurden 10,0 g Cholesterin (Chol) ⁽⁷⁾ in 100,0 ml Aceton im Wasserbad zum Sieden gebracht. Nach vollständiger Lösung des Cholesterins wurden 100,0 g neutrales Aluminiumoxid ⁽⁷⁾ langsam unter ständigem Rüh-

(1) Pharmacia fine Chemicals, Uppsala, Schweden

(2) K 25/45 (2,5 x 45,0 cm) Pharmacia, s.o.

(3) "Perpex", LKB-Produkte AB, Stockholm, Schweden

(4) "Ultrorac" R, LKB, s.o.

(5) "Uvicord" II, LKB, s.o.

(6) LKB, s.o.

(7) Riedel-de Haen, Seelze, Hannover

ren zugegeben. Das Rühren wurde bis zur Abkühlung fortgesetzt. Überschüssiges Aceton entfernte man durch Filtration, dann wurde die Masse zum Trocknen an der Luft auf Papier ausgebreitet und immer gut durchmischt. Letzte Acetonspuren konnten in einem Exsikkator unter Luftabschluß entfernt werden.

Die Adsorption des Kulturüberstandes wurde 3 x durchgeführt: 3,0 g, 2,0 g und 1,0 g ALO-Chol / 100,0 ml Überstand wurden 15, 8 und 15 Std. bei 4°C aufgelöst und ständig gerührt. Nach jedem Adsorptionsschritt mußte der Überstand durch Filtration vom ALO-Chol gereinigt werden, das dann in geringerer Konzentration erneut zugegeben wurde. Nach der letzten Adsorption konnte der so gereinigte Überstand mit gesättigter ASL konzentriert werden. Nach 2 - 3 Tagen war ein Protein-Präzipitat als Bodensatz ausgefallen. Dieses wurde in 10,0 ml PBS-Puffer gelöst und bei 12.000 x g in 20 Min. zentrifugiert. Die Auftragung der Proteine auf DEAE-Sephadex ⁽¹⁾ erfolgte in der gleichen Weise wie oben beschrieben.

Die Fraktionen mit PVL-Aktivität wurden gesammelt und durch Dialyse gegen gesättigte ASL erneut konzentriert. Das so präzipitierte PVL wurde in 18,0 ml PBS mit 5%iger ASL beim pH 7,0 gelöst. Nachdem diese Lösung bei 12.000 x g in 10 Min. klarzentrifugiert worden war, wurden 2,0 g vorher in PBS-ASL gewaschenes ALO zugegeben und 1 Std. bei 4°C gerührt. Das ALO wurde anschließend bei 12.000 x g in 10 Min. ausgewaschen. Der Adsorptionsprozess wurde mit 1,0 g und 0,5 g ALO wiederholt.

Als Kontrolle zu dieser Versuchsanordnung diente die Proteinfällung durch 3 M ASL ohne vorherige Adsorption an ALO-Chol.

H. PVL - Antikörper

Zur PVL-Antikörper Herstellung wurden Kaninchen mit dem Gewicht

(1) Pharmacia, Uppsala, Schweden

2,0 kg verwendet. Den Tieren wurde vor Versuchsbeginn jeweils 20,0 ml Nativblut entnommen, um einen schon vorhandenen Antikörpergehalt gegen C₃₃₈-PVL vor der Immunisierung mit PVL-Rohtoxin zu überprüfen. Die Immunisierung erfolgte durch subkutane Injektionen im Abstand von einer Woche. Insgesamt wurde 4 x immunisiert. Bei jeder Injektion wurden 15,0 mg (gelöst in 0,5 ml einer 0,14 M NaCl-Lösung) des durch Chromatographie über Sephadex G 100 vorgereinigten Toxins in Verbindung mit der gleichen Menge inkompletten Freund'schen Adjuvans ⁽¹⁾ verwendet. Nach der letzten Injektion wurde 10 Tage gewartet, um dann das Antiserum durch Herzpunktion zu gewinnen.

Zuerst mußte der Gehalt der Antiseren an I.E. Anti-PVL ermittelt werden. Dazu wurden Standard-Antiseren nach SKEGG und ANDERSON (1969) verwendet. Durch homologe Antiseren wurde nach der Methode von ROBINSON (1950) die Neutralisation der leukoziden Wirkung des PVL von V₈, P₈₃ und C₃₃₈ ermittelt. Diese Neutralisation der PVL-Wirkung wurde an den Leukozyten-Präparaten der beschriebenen Weise nachgewiesen:

Menschenleukozyten bei der Untersuchung des Antiserums von V₈, Rinderleukozyten bei der Untersuchung des Antiserums von P₈₃, und Hundeleukozyten bei der Untersuchung des Antiserums von C₃₃₈. Anschließend wurde in einer Kreuzreaktion die PVL-Wirkung jedes Stammes durch die beiden heterologen Antiseren neutralisiert, wobei die Antiseren jeweils zur Inaktivierung des vorhandenen Komplements 20 Min. bei 56°C erhitzt wurde.

I. Immunelektrophorese

Die erstmals 1953 mitgeteilte, von GRABAR und WILLIAMS entwickelte Methode der Immunelektrophorese stellte eine Kombination eines

(1) Difco-Laboratories, Detroit 1, Michigan, USA

physikalisch-chemischen und eines immunchemischen Untersuchungsverfahrens dar. In einem Agargel wurden zunächst die Proteingemische elektrophoretisch aufgetrennt und dann der Einwirkung eines präzipitierenden Antiserums ausgesetzt. Dies geschah dadurch, daß das in eine Rinne verbrachte Antiserum im Agar gegen die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine diffundieren konnte. Beim Zusammenreffen mit den jeweils homologen Antigenen im Agar bildeten sich gebogene Präzipitatlinien.

In der vorliegenden Versuchsanordnung wurde die elektrophoretische Auftrennung der Antigene in 4 Std. bei 4°C im Veronalpuffer T = 0,1 beim pH. 8,6 mit 12 mA/Elektrophoreseschiene durchgeführt. Daran anschließend wurden die Seitenrinnen mit Antiserum beschickt. Dabei wurde das PVL-Toxin jeweils mit 3 Antiseren präzipitiert: V₈-PVL mit Anti-V₈, Anti-P₈₃ und Anti-C₃₃₈; P₈₃-PVL mit Anti-V₈, Anti-P₈₃ und Anti-C₃₃₈; C₃₃₈-PVL mit Anti-C₃₃₈, Anti-V₈ und Anti-P₈₃.

Nach 24 Std. bei Zimmertemperatur konnten die Präzipitatbögen abgelesen werden. Zugleich wurde aus 1 cm breiten Abschnitten der Kontrollelektrophorogramme die vorhandenen Antigene 24 Std. bei 4°C in PBS-Puffer extrahiert und auf ihren Gehalt an PVL, Phosphatase und DNase untersucht. Dadurch konnte eine annähernde Zuordnung der Präzipitatbögen zu den vorhandenen Aktivitäten erreicht werden.

Um eine besonders gute Sichtbarmachung der Präzipitatbögen zu erreichen, wurde ihr Anfärbung mit Amidoschwarz nach SCHEIDEGGER (1955) vorgenommen. Dazu wurde die Agarplättchen mit den Immunpräzipitaten 1 - 2 Tage in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, um alles nicht präzipitierte Protein aus dem Agar zu entfernen. Danach wurden die gewaschenen Plättchen mit Filterpapier bedeckt und im Brutschrank völlig getrocknet. Nach Abnahme des Filterpapiers wurden die Agarplättchen 5 Min. in 2% Essigsäure gelegt. Zur An-

färbung wurde 7 Min. mit 0,5%igem Amidoschwarz 10 E in Methanol-Eisessig (9 / 1) weiterbehandelt. Ausgewaschen wurde 15 Min. mit Methanol-Eisessig der gleichen Zusammensetzung.

IV. ERGEBNISSE

A. Merkmale der Staphylokokkenkulturen

Von den 243 untersuchten Staphylokokkenkulturen erwiesen sich 197 (= 81%) auf Grund ihrer Koagulasebildung und Mannitvergärung als S.aureus, 46 (= 19%) wurden S.epidermidis zugeordnet (BREDD et al., 1957).

Aufgrund der Kristallviolettreaktion gehörten 178 (= 73%) Kulturen der Variatio canis und 65 (= 27%) der Variatio bovis an. Er lag somit eine recht große Anzahl von "bovinen" Staphylokokkenkulturen vor, die aus eitrigen Hauterkrankungen vom Hund isoliert worden war.

B. PVL - Bildung

Als erstes wurde untersucht, ob die 243 Kulturen Panton-Valentine-Leukozidin bildeten. Die typischen Veränderungen sollten an Mensch-, Rinder- und Hundeleukozyten beobachtet werden. Insgesamt bildeten 146 (= 62%) aller untersuchten Kulturen PVL, wobei von diesen 100 (= 68%) zu S.aureus und 46 (= 32%) zu S. epidermidis gehörten.

Es stellte sich somit heraus, daß die zu S.epidermidis gehörenden Kulturen ebenfalls PVL bilden konnten.

Weiterhin war zu überprüfen, ob die PVL-positiven Kulturen aus Staphylokokken vom Hund ihre Wirkung nur auf Hundeleukozyten oder auch auf Leukozyten anderer Tierspezies ausüben konnten. Von allen PVL-positiven Kulturen wirkten 134 (= 57%) gleichermaßen auf Menschen-, Rinder- und Hundeleukozyten. Zwei Kulturen (= 0,8%) waren nur auf Hundeleukozyten, 6 (= 2,5%) nur auf Rinderleukozyten und 4 Kulturen (= 1,7%) nur auf Menschenleukozyten wirksam. (Tabelle 2)

Tabelle 2

PVL - Wirksamkeit der "caninen" Staphylokokkenkulturen

Kulturen	Anzahl	%
Gesamtzahl	243	100
PVL - positiv	146	62
PVL - positiv mit Ml, Rl + Hl ⁺	134	57
PVL - positiv nur mit Hl	2	0,8
PVL - positiv nur mit Rl	6	2,5
PVL - positiv nur mit Ml	4	1,7

/+ Hl = Hundeleukozyten

Rl = Rinderleukozyten

Ml = Menschenleukozyten

Es schien demnach keinen Zusammenhang zwischen der Zugehörigkeit der PVL-positiven "caninen" Staphylokokkenkulturen zur Variatio canis und ihrer spezifischen Wirkung nur auf Hundeleukozyten zu bestehen, da die meisten Kulturen auch auf die Granulozyten anderer Tierspezies wirkten.

Beim Vergleich der ermittelten MleD-Werte mit anderen Untersuchern war festzustellen, daß die leukozide Aktivität nicht so hoch lag (WENK, 1969; SOEOLL, 1971). Ein MleD-Wert zwischen 4 und 8 war am meisten zu finden. Dabei fiel auf, daß Kulturen mit hohem MleD-Wert auf Rinderleukozyten, nicht aber auf Menschenleukozyten wirksam waren. (Tabelle 3)

Tabelle 3

MleD-Werte⁺ bei Einwirkung von PVL - positiven Kulturen auf Hunde-, Rinder- und Menschenleukozyten

MleD	Anzahl der PVL-positiven Kulturen (gesamte Menge: 146)		
	PVL-Wirkung auf HI	PVL-Wirkung auf RI	PVL-Wirkung auf MI
1	3	5	23
2	27	9	38
4	30	33	40
8	38	43	29
16	17	31	16
32	1	19	/
64	/	6	/

/+ MleD = minimale leukozide Dosis

Es ergab sich also, daß die PVL bildende *S.aureus*-Kulturen vom Hund nicht nur auf Hundeleukozyten, sondern auch auf Rinder- und Menschenleukozyten in charakteristischer Weise wirksam waren.

Von den PVL-positiven Kulturen mit Wirkung auf "canine" Staphylokokken erreichten 17 den MleD-Wert von 16 und 1 Kultur den Wert 32. Für die weiteren Untersuchungen kam es nun darauf an, Kulturen mit relativ hoher MleD und niedriger MHD (=minimaler hämolytischer Dosis der Hämolysine) zu finden. Bei Überprüfung der alpha-, beta- und delta-Hämolysinaktivitäten wurden 4 Kulturen mit hohem MleD-Wert von 16 oder 32 und zugleich niedrigen MHD-Werten gefunden. (Tabelle 4)

Tabelle 4

PVL-positive Kulturen mit relativ hohen MleD- und niedrigen MHD-Werten

Kultur-Nr. C_x	PVL-MleD Hl/ml	MHD-Wert des alpha-Hämolys.	Koagulase- bildung	Wirkung auf	
				Rl	MI
84	16	8	+	1	1
284	16	2	+	4	2
286	16	8	+	4	2
338	32	4	+	8	1

Zur näheren Charakterisierung der 4 für die weiteren Untersuchungen geeigneten Kulturen C_{84} , C_{284} , C_{286} und C_{338} wurde die PVL-Wirkung außer an den schon angegebenen Spezies (Hund, Rind und Mensch) noch an Schaf-, Pferde-, Kaninchen- und Meerschweinchenleukozyten untersucht. An Enzymen wurden die Phosphatase, DNase, Gelatinase, Tributyrinase sowie das Fibrinolysin und der Eigelbfaktor getestet. Die Bestimmung des Proteingehaltes in mg/ml gab einen Anhaltspunkt über die Menge des vorhandenen Proteins. Bei diesen Untersuchungen stellte sich heraus, daß die Kultur C_{338} auf der Schafblutagarplatte in 2 grobsinnlich zu unterscheidenden Formen vorkam: einmal mit stark ausgeprägter Hämolyszone um die gewachsenen Einzelkulturen, zum anderen ohne hämolytische Zersetzung des Mediums. Das zeigte sich anschließend bei der Bestimmung der MHD des alpha-Hämolysins: die Kultur mit stark sichtbarer Hämolyszone (C_{338+}) hatte einen MHD-Wert von 64; die Kultur ohne Hämolys (C_{338-}) wies lediglich den MHD-Wert 4 auf. So wurden alle späteren Arbeiten nur mit der

Kultur C₃₃₈- ohne sichtbarer Hämolysezone durchgeführt, weil durch die geringere alpha-Hämolysinbildung die Entfernung desselben beim Reinigungsvorgang erleichtert schien. (Tabelle 5)

Weiterhin wurden die 4 obigen Kulturen auf ihre Penicillinasebildung hin untersucht. Beim Test auf CY-Platten ließ sich keine Penicillinasereaktion nachweisen. Auch waren alle 4 Kulturen im Antibiotogramm Penicillin-empfindlich. Die Kultur C₃₃₈- war außerdem für Erythromycin, Methicillin, Ampicillin und Tetracycline empfänglich. (Tabelle 6)

C. Wachstum und Toxinbildung

Zur Produktion mit nachfolgender Anreicherung von PVL der vorliegenden Staphylokokkenkulturen vom Hund war die Kenntnis über das Wachstum und Verhalten der Teststämme in LO₃-Nährbouillon erforderlich. Dazu mußte eine Toxin-Wachstums-Kurve aufgestellt werden aus der hervorging, zu welchem Zeitpunkt in der Vor- und Hauptkultur die höchste PVL-Ausbeute bei möglichst beschränkten MHD-Werten zu erhalten war.

Die günstigste Bebrütungszeit für die "canine" Staphylokokkenkultur C₃₃₈- in LO₃-Bouillon lag für die Vorkultur bei 10 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt war die logarithmische Wachstumsphase der Staphylokokken abgeschlossen, der MleD-Wert lag bei 32, die MHD-Werte für alpha-Hämolysin lagen bei 32, für beta-Hämolysin bei 16 und für delta-Hämolysin bei 8. (Abb. 1)

In der Hauptkultur erreichte die logarithmische Wachstumsphase nach 30 Std. ihren Endpunkt. Nach dieser Zeit war ein MleD-Wert des PVL von 128 feststellbar, der deutlich über den MHD-Werten des alpha-Hämolysins mit 32, des beta-Hämolysins mit 32 und des delta-Hämolysins mit 8 lag. (Abb. 2)

Eigenschaften der PVL-positiven Kulturen C₈₄, C₂₈₄, C₂₈₆, C₃₃₈₊ und C₃₃₈₋

Kultur-Nr. C _x	PVL-MleD an ⁺⁺							MHD d.Hämolys.			Enzyme ⁺⁺⁺					Proteingeh. in mg ml	
	MI	RI	HI	KI	SI	PI	Mel	alpha	beta	delta	EF	F	Ph	DN	T		G
84	1	1	16	64	2	2	2	8	32	8	64	8	1	256	32	32	0.73
284	2	4	16	512		1	1	2	16	32	8	16	2	256	32	64	0.36
286	2	4	16	128	2	2		8	8	4	16	4	8	128	64	64	1.42
338+	1	8	32	64	16	4	8	64	64	4	8	4	4	64	16	32	1.12
338-	4	16	512	256	16	16	4	4	8	2	2	2	4	64		64	1.23

+ C₃₃₈₊ = Kultur C₃₃₈ mit sichtbarer Hämolyse

C₃₃₈₋ = Kultur C₃₃₈ ohne Hämolyse

++ Kl = Kaninchenleukozyten

Sl = Schaflleukozyten

Pl = Pferdeleukozyten

Mel = Meerschweinchenleukozyten

/+++ EF = Eigelbfaktor

F = Fibrinolytin

Ph = Phosphatase

DN = DNase

T = Tributyrinase

G = Gelatinase

Tabelle 6

Antibiogramm für die PVL-positiven Kulturen C₈₄, C₂₈₄, C₂₈₆
und C₃₃₈-

Antibiotika ⁺	Kulturen			
	C ₈₄	C ₂₈₄	C ₂₈₆	C ₃₃₈ -
Chloramphenicol	E	R	E	R ⁺⁺
Erythromycin	E	E	E	E
Sulphafurazole	R	R	(R)	R
Methicillin	E	E	E	E
Penicillin G	E	E	E	E
Ampicillin	R	R	E	E
Streptomycin	R	R	R	R
Tetracycline	E	R	E	E

/+ Multodisk Teststerne von Oxoid

++ E = Empfindlichkeit

R = Resistenz

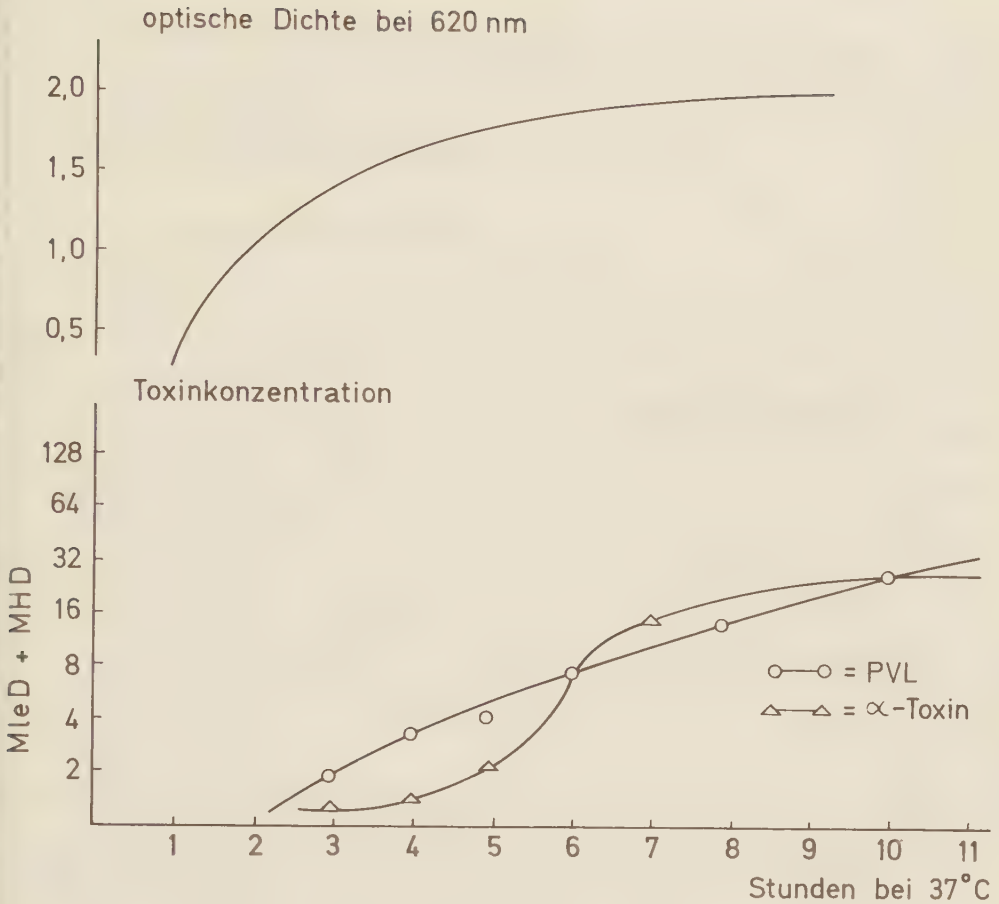


Abbildung 1

Wachstum und Toxinkonzentration des "caninen" Staphylokokkenstammes C₃₃₈₋ in der Vorkultur (etwa 5 Bakterienkolonien in 10,0 ml LO₃-Bouillon suspendiert)

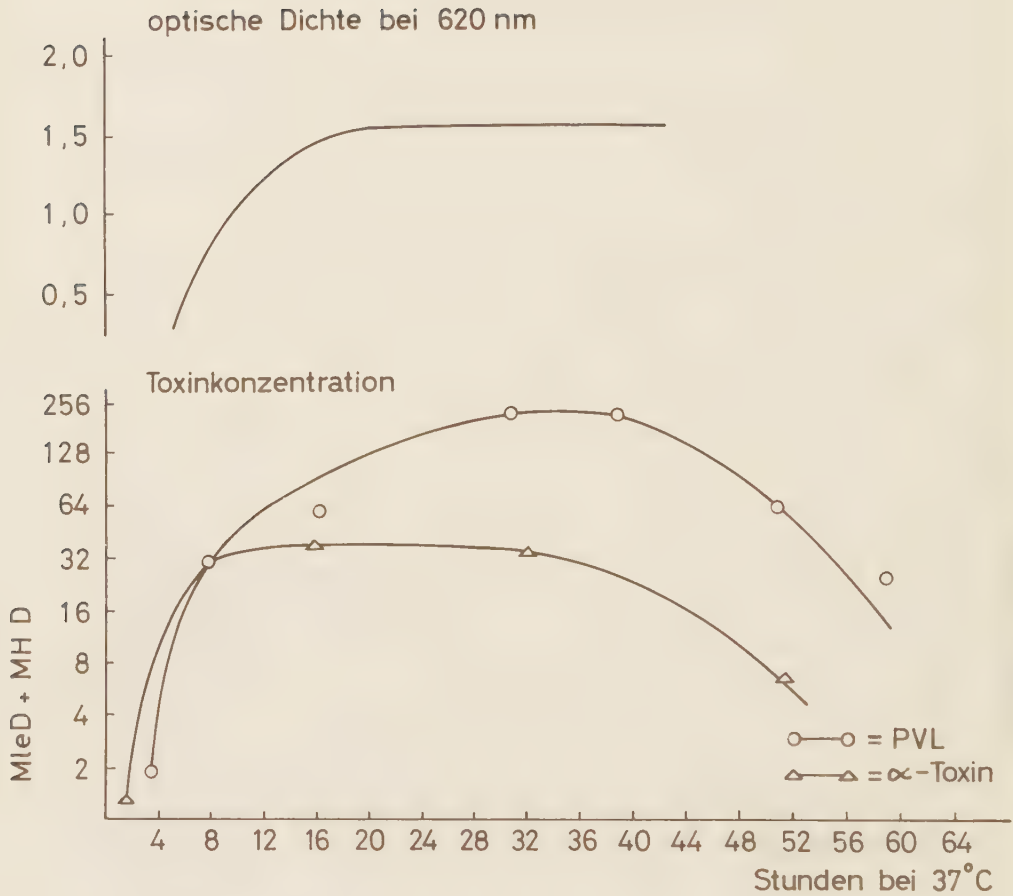


Abbildung 2

Wachstum und Toxinproduktion des "caninen" Staphylokokkenstammes C₃₃₈- in der Hauptkultur (20,0 ml der 10 Std. bei 37°C bebrüteten Vorkultur in 180,0 ml LO₃-Bouillon)

Die "canine" Staphylokokkenkultur C₃₃₈- mußte also zur Erreichung einer optimalen Bakterien- und Toxinausbeute in der LO₃-Vorkultur 10 Std. und in der LO₃-Hauptkultur 30 Std. bei 37°C auf der Schüttelmaschine bebrütet werden.

D. Reinigungsversuche des PVL

Nach der Proteinfällung im Kulturüberstand durch 3 M ASL und anschließender Konzentration des Filtrates in Polyäthylenglykoll gelang die vollständige Entfernung der Aktivitäten des alpha-, beta- und delta-Hämolysins. Durch zweimalige Auftrennung der Proteine vom Stamm C₃₃₈- über Sephadex G 100 konnte die PVL-Aktivität in einen Peak eingengt werden. Die völlige Entfernung der Hämolysine legte den Schluß nahe, daß in diesem Peak das PVL in nahezu reiner Form vorliegen könnte. Das war aber nicht der Fall, da im gleichen Peak die Aktivitäten der Phosphatase und DNase lagen, die nicht von der PVL-Aktivität zu trennen waren. Der Proteingehalt stieg von 1,23 mg/ml Kulturüberstand auf 3,56 mg/ml des vorgereinigten PVL-Rohtoxins nach der zweiten Auftrennung über Sephadex G 100-Gel. (Tabelle 7, Abb. 3 und 4)

Als Ausgangsmaterial zur selektiven Toxinadsorption mit Aluminiumoxid-Cholesterin (ALO-CHOL) diente der Kulturüberstand von C₃₃₈- mit einer PVL-MleD von 512, den MHD-Werten für alpha-Hämolysin von 4, für beta-Hämolysin von 16 und delta-Hämolysin von 2. Außerdem waren die Aktivitäten der Phosphatase, DNase und Gelatinase vorhanden. Der Proteingehalt lag bei 1,23 mg/ml Überstand.

Drei l dieses Kulturüberstandes wurden jeweils mit 3%, 2% und 1% ALO-CHOL bei 4°C adsorbiert. Dabei konnten die Aktivitäten des alpha- und delta-Hämolysins entfernt werden. Parallel dazu sank aber der PVL-MleD-Wert auf 32. Deshalb sollte durch gesättigtes Ammoniumsulfat das Protein im jetzt wieder von ALO-CHOL gerei-

Tabelle 7

Anreicherung von PVL durch Proteinfällung mit 3 M ASL und
Trennung über Sephadex G 100-Gel

Methode	PVL-MleD von C ₃₃₈ -	MHD der Hämolyse			Ph	DN	G ⁺	Proteingehalt in mg/ml
		alpha	beta	delta				
Kulturüberstand	512	4	8	2	4	64	64	1,23
Proteinfällung mit 3 M ASL	1024	/	2	/	4	16	8	1,17
Protein gegen Polyäthylenglykoll	2048	/	/	/	8	128	2	2,26
1. Fraktionierung über Sephadex G 100	1028	/	/	/	16	64	/	2,05
Fraktionen Nr. 11-23 mit ges. ASL	512	/	/	/	16	64	/	3,01
2. Fraktionierung über Sephadex G 100	1028	/	/	/	8	64	/	3,56

/+ Ph = Phosphatase

DN = DNase

G = Gelatinase

Abbildung 3

1. Fraktionierung des mit 3 M ASL ausgefällten und über Polyäthylenglykoll eingeeengten Kulturüberstandes vom "caninen" Staphylokokkenstamm C₃₃₈- über Sephadex G 100

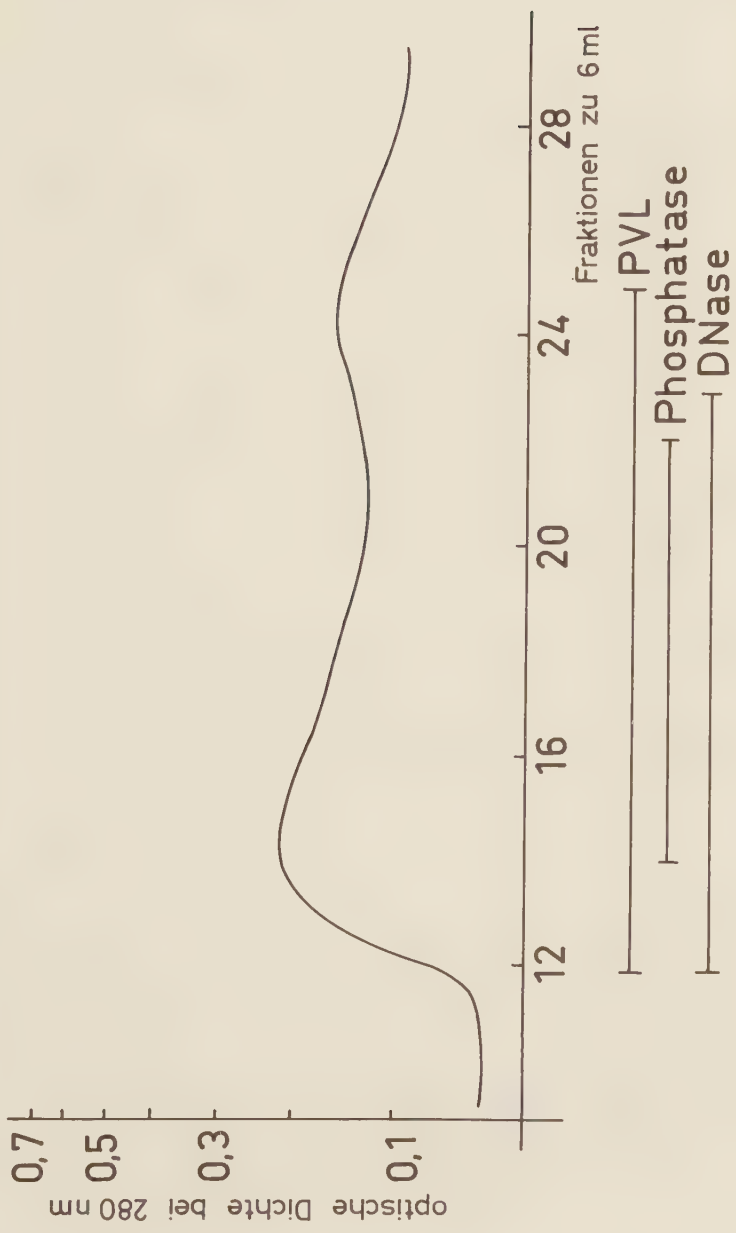
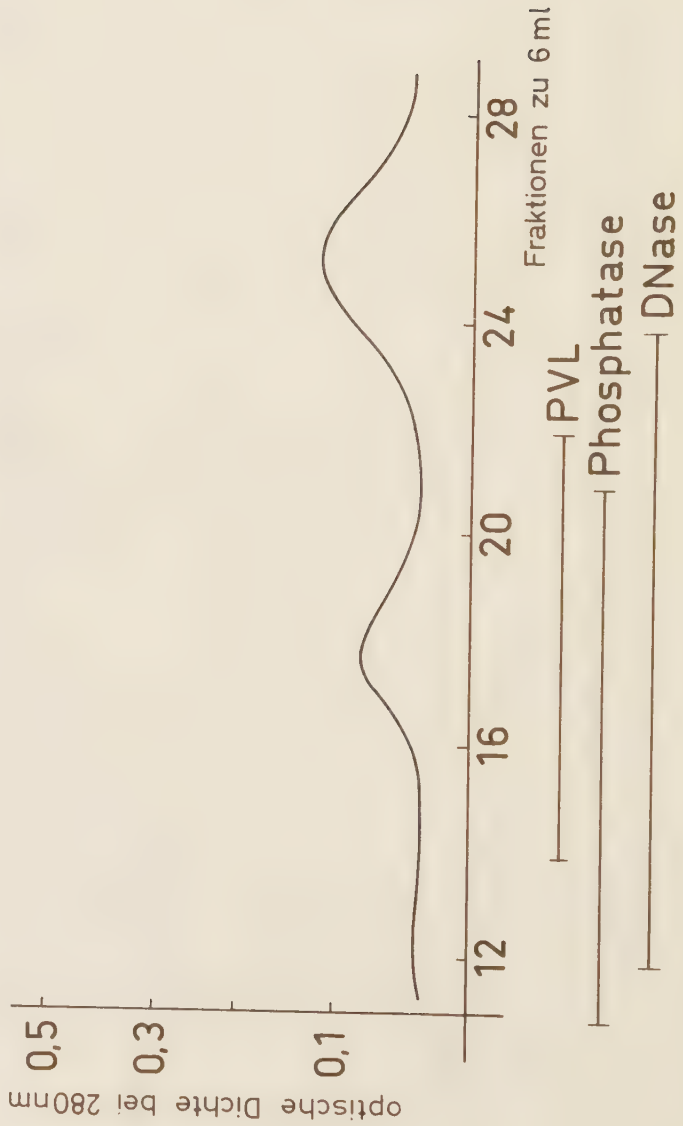


Abbildung 4

2. Fraktionierung des mit 3 M ASL ausgefällten und über Polyäthylenglykoll eingeeengten Kulturüberstandes vom "caninen" Staphylokokkenstamm C₃₃₈- über Sephadex G 100



nigten Überstand ausgefällt werden. Dabei stiegen die PVL-Werte auf 64, aber die MHD des beta-Hämolysins stieg ebenfalls auf 64 an. Zur Auftrennung der Proteine wurde diese konzentrierte Lösung über DEAE-Sephadex geschickt. Der MleD-Wert stieg danach auf 128/ml. Die Fraktionen mit PVL-Aktivität wurden gesammelt und erneut durch Dialyse gegen gesättigte ASL eingengt. Eine sich nun anschließende 3-fache Adsorption an vorher gewaschenes Aluminiumoxid (ALO) sollte die noch vorhandenen Phosphatase- und DNase-Aktivitäten entfernen. Das gelang aber nicht. Vielmehr schien auch die PVL-Aktivität mit adsorbiert zu werden, so daß der MleD-Wert nach der 3. Adsorption auf 16/ml abgesunken war. Dieser Wert lag um das 5-fache niedriger als der PVL-MleD-Wert des unbehandelten Kulturüberstandes. In einem Kontrollversuch wurde der Kulturüberstand ohne vorherige Adsorption an ALO-Chol mit 3 M ASL eingengt und ausgetestet. Dabei ergab sich ein PVL-Wert von 2048/ml, die Hämolysinaktivitäten waren eliminiert, und nur die Phosphatase- und DNase-Aktivitäten ließen sich nachweisen. (Tabelle 8, Abb. 5)

Somit ließ sich sagen, daß das Verfahren der selektiven Toxinadsorption an ALO-Chol mit anschließender Proteinfällung durch gesättigte ASL und Auftrennung der Proteine über DEAE-Sephadex zur Anreicherung und Reinigung des PVL vom "caninen" Staphylokokkenstamm C₃₃₈₋ nicht geeignet zu sein scheint.

E. Serologische Untersuchungen

Durch serologische Untersuchungen wurde versucht festzustellen, ob zwischen den von Mensch, Rind und Hund isolierten PV-Leukozidinen Unterschiede bestehen. Dazu wurden die PVL-positiven Stämme V₈ vom Menschen, P₈₃ vom Rind und C₃₃₈₋ vom Hund benutzt.

In der Neutralisationsreaktion wurde die neutrailierende Wirkung der einzelnen Antiseren gegen das PVL der jeweiligen zugeordneten Staphylokokkenstämme nachgewiesen. Durch die Verwendung standartisierter

Tabelle 8

Anreicherung von PVL durch Adsorption an Aluminiumoxid-Cholesterin mit anschließender Proteintrennung über DEAE-Sephadex-A50

Methode	PVL-MeD vom Stamm C ₃₃₈ -	MHD der Hämolyse			Enzyme			Proteingehalt in mg/ml
		alpha	beta	delta	Ph ⁺	DN ⁺	G ⁺	
Kulturüberstand	512	4	16	2	4	64	64	1, 23
1. Adsorption an 3% ALO-CHOL, 15 Std. bei 4°C	64	1	8	2	32	32	16	
2. Adsorption an 2% ALO-CHOL, 8 Std. bei 4°C	32	/	4	2	2	32	8	
3. Adsorption an 1% ALO-CHOL, 15 Std. bei 4°C	32	/	4	/	2	8	8	0, 16
Dialyse gegen ges. ASL, Präzipitat in 10 ml PBS	64	/	64	/	4	64	2	
DEAE-Sephadex	128	/	4	/	4	32	/	1, 13
Faktionen Nr. 24-38 mit ges. ASL eingengt	256	/	/	/	8	32	/	
Adsorption an 2% ALO	128	/	/	/	4	32	/	
Adsorption an 1% ALO	64	/	/	/	4	16	/	
Adsorption an 0,5% ALO	16	/	/	/	4	32	/	1, 56
Kontrolle: Überstand + 3 M ASL + Dialyse gegen Polyäthylenglykoll	2048	/	/	/	8	128	2	2, 25

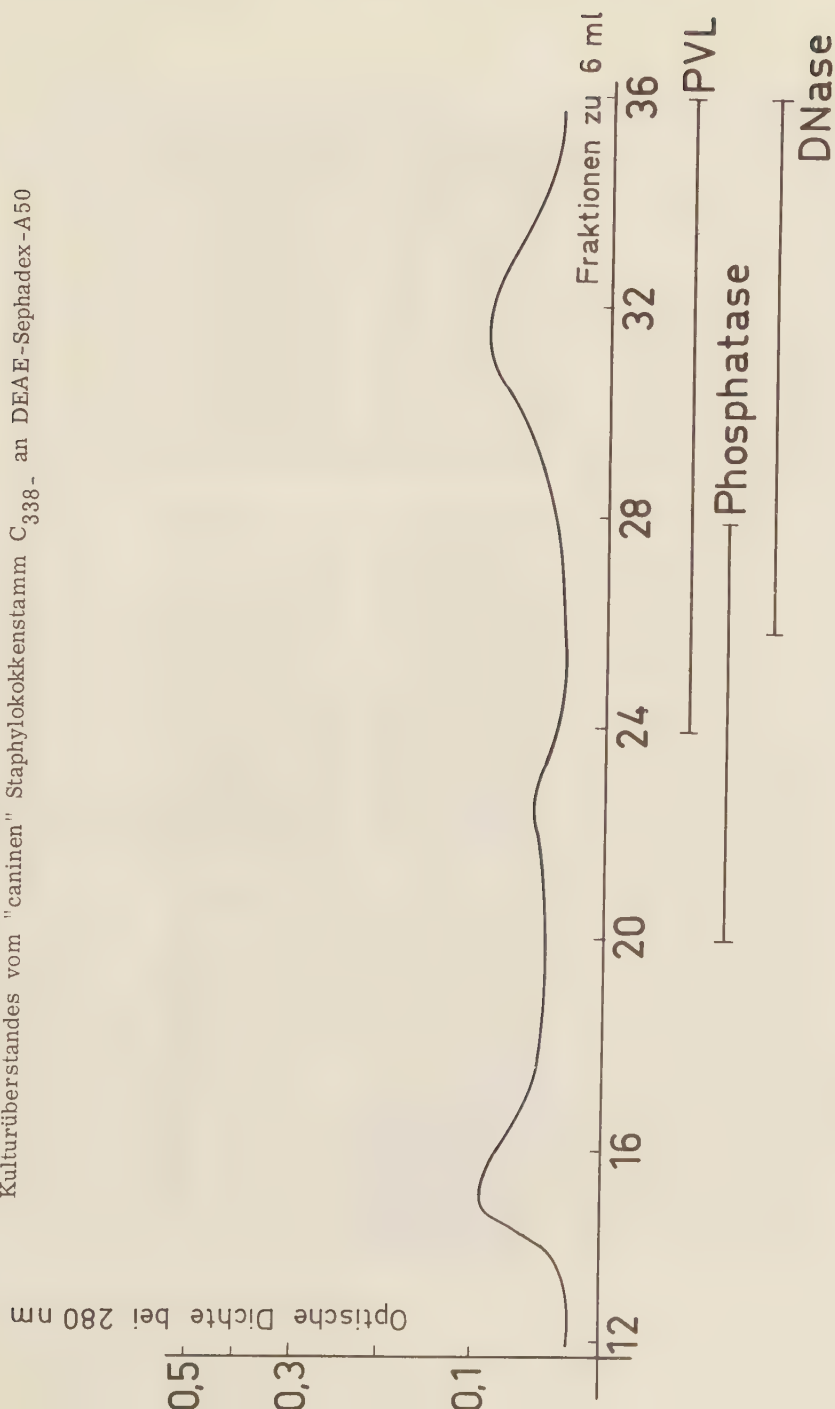
/+ Ph = Phosphatase

DN = DNase

G = Gelatinase

Abbildung 5

Fraktionierung des an Aluminiumoxid-Cholesterin adsorbierten Kulturüberstandes vom "caninen" Staphylokokkenstamm C₃₃₈- an DEAE-Sephadex-A50



Antiseren war es weiterhin durch die Neutralisationsreaktion möglich, den Gehalt der Immunseren an I.E. Anti-PVL zu ermitteln. Demnach waren in 1,0 ml Antiserum bei $V_8 = 10$ I.E., bei $P_{83} = 64$ I.E. und bei $C_{338-} = 40$ I.E. Anti-PVL enthalten.

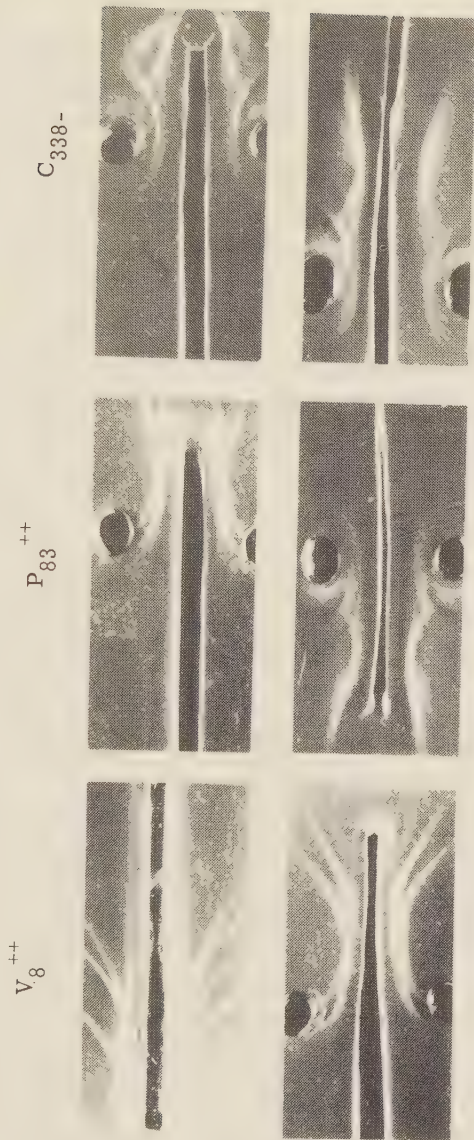
In einer anschließend durchgeführten Kreuzreaktion ließ sich nachweisen, daß die Neutralisation der PVL-Wirkung bei den untersuchten Stämmen sowohl durch die homologen als auch durch die jeweils getesteten heterologen Antiseren zu erreichen war. Daraus ergab sich, daß die untersuchten PVL-positiven Staphylokokkenstämme von Mensch, Rind und Hund mit Hilfe der angewandten serologischen Untersuchungsverfahren nicht zu unterscheiden waren.

F. Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese mit dem durch Gelfiltration über Sephadex G 100 angereicherten Material ergab folgende Ergebnisse: im Immunelektrophorogramm erschien für V_8 eine Anzahl verschiedener Präzipitationslinien. Bei P_{83} und C_{338-} konnte nur je eine Präzipitationslinie beobachtet werden. Aus parallel laufenden Kontrollelektrophorogrammen mit dem jeweils zu den einzelnen Stämmen gehörenden Anti-PVL wurde durch Austesten der mit PBS-Puffer 24 Std. bei 4°C extrahierten Proteine die Zugehörigkeit der Linien zur PVL-, Hämolyisin- und Enzymaktivität bestimmt. Dabei stellte sich heraus, daß bei V_8 2 PVL-Präzipitationslinien, bei P_{83} und C_{338-} aber nur je eine Linie mit PVL-Aktivität nachzuweisen war. Außerdem ließ sich bei C_{338-} die Aktivität des PVL, der Phosphatase und der DNase je einer Präzipitationslinie zuordnen. Damit ließ sich auch auf serologischem Weg bestätigen, daß durch Fällung mit 3M ASL und anschließender 2-maliger Trennung der Proteine über Sephadex G 100 eine Reinigung des C_{338-} -PVL von den Hämolyisinen möglich war. Lediglich die Phosphatase- und DNase-Aktivitäten waren nicht zu entfernen. (Abb. 6)

Abbildung 6

Immunelektrophorogramm⁺ der durch Filtration über Sephadex G 100
vorgereinigten PVL-Präparate der Staphylokokkenstämme V₈, P₈₃ und C₃₃₈.



Rinne mit Standard-Anti-PVL

/+ elektrophoretische Trennung in 4 Std. bei 4°C und 12 mA/Elektrophorese-
schiene in Veronalpuffer des pH-Wertes 8,6
/++ die über Sephadex G 100 vorgereinigten Präparate von V₈ und P₈₃ stammen
von Frau Dr. H. Soboll, Institut für Bakteriologie und Immunologie der Justus
Liebig-Universität zu Gießen

V. DISKUSSION

Bis heute war wenig über die Bedeutung des PVL bei Staphylokokken-erkrankungen des Hundes bekannt. Einen Hinweis auf eine mögliche Rolle im Pathogenitätsgeschehen fand VAN DE VELDE (1894) bei seinen Infektionsversuchen mit Kulturfiltrat aus "humanen" Staphylokokken an Versuchshunden. Er wollte damit die charakteristischen Zellveränderungen an den Hundegranulozyten hervorrufen, was ihm aber nicht gelang. Wahrscheinlich scheiterte er an der mangelnden Reinheit seiner Leukozytensuspensionen von Hundeleukozyten. RIGDON (1935) stellte pathologisch-anatomische Untersuchungen an. Er fand typische Veränderungen im Magen-Darmtrakt und in der Peritonealhöhle seiner Versuchshunde. Zellveränderungen an den weißen Blutzellen beschrieb er nicht. Über die Wirkung des PVL konnte er auch nur Vermutungen äußern, denn er interpretierte die meisten pathologischen Veränderungen als Folge der Hämolysineinwirkung. WENK (1969) untersuchte 52 "canine" Staphylokokkenstämme. Von diesen bildeten 38% PVL mit einem relativ niedrigen M₁ED-Wert zwischen 4 und 16/ml. Bemerkenswert schien weiterhin, daß er nur bei koagulase-positiven Stämmen eine PVL-Bildung ermitteln konnte. Nach seinen Angaben riefen die PVL-positiven Stämme an Rindergranulozyten keine typischen Schädigungen hervor. Leukozyten vom Menschen wurden nur wenig angegriffen.

Im Gegensatz dazu konnte bei eigenen Untersuchungen die typische Zellveränderung an Leukozyten von Mensch, Rind, Pferd, Hund, Schaf, Kaninchen und Meerschweinchen beobachtet werden. Dabei war zu sehen, daß die Kerne der Kaninchengranulozyten häufig eine hufeisenförmige gebogene Gestalt annahmen, sich zu größeren Haufen zusammenlegten und zu letzt ihr Zytoplasma und ihre Form ganz verloren. Dieser Befund konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gedeutet werden. Hinweise auf eine alpha-Hämolysin-Wirkung wurden durch Hämolysetests entkräftet, denn es ließ sich in dem relativ reinen PVL-Rohtoxin kein alpha-

Hämolysin nachweisen.

Außerdem war die Zahl der PVL-positiven Kulturen mit 62% bedeutend höher. Weiterhin zeigte sich, daß koagulase-negative Kulturen und S.aureus- sowie S.epidermidis-Stämme PVL bilden konnten.

Die Frage, ob "canine" Staphylokokkenkulturen mit PVL ihre Wirkung nur auf Hundeleukozyten in spezifischer Weise ausüben könnten, mußte verneint werden. Vielmehr wirkten die Kulturen der Variatio canis und der Variatio bovis gleichermaßen auf die untersuchten Leukozytenarten. Es konnte also angenommen werden, daß PVL von "caninen" Staphylokokken nicht in artspezifischer Weise nur auf Hundeleukozyten wirkten, sondern daß PVL eine Rolle im Pathogenitätsgeschehen bei Staphylokokkenkrankungen auch bei anderen Tierspezies spielen könnte. Damit wurde aber die eingangs getroffene Feststellung über die Gefährlichkeit der "caninen" Staphylokokken für seine Umgebung unterstrichen.

Nach den Untersuchungen dieser Arbeit liegt ein Hinweis dafür vor, daß PV-Leukozidin bei Staphylokokkeninfektionen der Haut des Hundes als Pathogenitätsfaktor eine Rolle spielen kann. Die völlige Reinigung, die in dieser Arbeit nicht gelang, wäre die notwendige Voraussetzung dafür, daß Versuche zur Behandlung hartnäckiger eitriger Hautinfektionen mit Hilfe einer Staphylokokkenvakzine unternommen werden könnten.

Von der Frage ausgehend, ob es möglicherweise ein spezifisch auf Hundeleukozyten wirksames PVL gäbe, das von den schon untersuchten PV-Leukozidinen der Staphylokokken bei Mensch und Rind verschieden sei, wurde der PVL-positive "canine" Staphylokokkenstamm C₃₃₈-serologisch untersucht.

Gegen das Vorhandensein eines "Hundeleukozidins" sprach die Tatsache, daß eine spezifische Neutralisation der 3 verglichenen PVL-Toxine durch Anti-PVL nicht zu beobachten war. Das PVL von C₃₃₈- zeigte nach der Neutralisation durch Antiserum von V₈ und P₈₃ keine Wirkung mehr auf

Hundeleukozyten. Es war also inaktiviert worden. Die Immunelektrophorese sollte wegen der Möglichkeit einer eventuell unspezifischen Neutralisation dieser Reaktion klären. Dabei stellte sich heraus, daß bei V_8 2 Präzipitationslinien, bei P_{83} und C_{338} aber jeweils nur 1 solche Linie zu sehen war. Das könnte bedeuten, daß beim PVL von Rind und Hund im Gegensatz zum "humanen" PVL nur eine PVL-Komponente serologisch zu unterscheiden wäre. Diese Frage kann aber endgültig nur mit absolut reinem PVL-Material der 3 untersuchten Tierspezies entschieden werden.

Die Versuche zur Reinigung brachten als Teilerfolg die Entfernung der hämolytischen Aktivitäten. Die Phosphatase- und DNase-Aktivitäten waren nicht zu eliminieren, was in weiteren Versuchen neu zu erproben wäre. Hinweise für eine bessere Reinigungsquote ergaben erste Versuche mit Carboxymethyl-Zellulose. Durch dieses Material könnten die PVL-Proteine aus dem Kulturüberstand aufgefangen, in sehr konzentrierter Form mit PBS-Puffer oder 0,14 M NaCl-Lösung ausgewaschen und über Sephadex-Gel feineren Kornes aufgetrennt werden. Anschließend wäre eine elektrophoretische Trennung der Proteine von Verunreinigungen zu versuchen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Von 243 untersuchten "caninen" Staphylokokkenkulturen bildeten 146 (= 62%) Panton-Valentine-Leukozidin (PVL). Dieses PVL war auf Granulozyten von Mensch, Rind, Hund, Pferd, Schaf, Kaninchen und Meerschweinchen wirksam. Von allen PVL-positiven Kulturen wirkten 134 (= 57%) auf Menschen-, Rinder- und Hundeleukozyten in gleicher Weise, 2 (= 0,8%) wirkten nur auf Hundeleukozyten, 6 (= 2,5%) nur auf Rinder- und 4 (= 1,7%) nur auf Menschenleukozyten. Kaninchen-granulozyten wurden häufig in unspezifischer Weise verändert.

Ein Zusammenhang zwischen der PVL-Wirkung auf Hunde-, Rinder- oder Menschenleukozyten und ihre Zugehörigkeit zur Variatio canis, bovis oder hominis konnte nicht ermittelt werden.

Es wurde ein neues Verfahren zur Gewinnung von unbeschädigten lebenden Hundegranulozyten beschrieben.

PVL wurde mit 3 M Ammoniumsulfatlösung und anschließender Trennung über Sephadex G 100 teilweise gereinigt. Die Phosphatase- und DNase-Aktivitäten konnten dabei nicht entfernt werden.

Serologische Untersuchungen wurden an PVL von 3 Staphylokokkenstämmen durchgeführt: V_8 vom Menschen, P_{83} vom Rind und C_{338-} vom Hund. Im Neutralisationstest war die Unterscheidung der 3 PVL-Präparate nicht möglich. Im Immunelektrophorogramm entwickelte V_8 -PVL mit den homologen Antiseren 2 Präzipitationslinien, P_{83} und C_{338-} zeigten mit ihren homologen Antiseren jeweils nur 1 PVL-Präzipitationslinie.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. BÄNFFER, J.R.J. Antileucocidine bij staphylokokkeninfecties
 Proefschrift Utrecht (1962)
2. BÄNFFER, J.R.J. Anti-leucocidin and mastitis puerperalis
 Brit.med.J. 62, 1224 - 1226 (1962)
3. BAIL, O. Über leukozide Substanzen in den Stoffwechselprodukten des
 Staphylococcus pyogenes aureus
 Arch.Hyg. 32, 133 - 171 (1898)
4. BEHRENS, M., Gewinnung von Leukozyten aus Rinder-
 ESCH, F. blut unter Verwendung von Wasser als
 Hämolytikum
 Experientia 19, 406 - 407 (1963)
5. BERNHEIMER, A.W. Staphylococcal alpha toxin
 Ann.N.Y.Acad.Sci. 128, 112 - 123 (1965)
6. BLAKELY, C.L. Surgical drainage of the external ear
 canal
 In: "Canine Surgery" 3rd Ed., American
 Veterinary Publications, Evanston 3,
 283 - 294 (1952)
7. BØYUM, A. Separation of white blood cells
 Nature 204, 793 - 794 (1964)
8. BØYUM, A. A one stage procedure for isolation of
 granulocytes and lymphocytes from human
 blood
 Scand.J.Clin.Lab.Invest. 21, Suppl. 97,
 51 - 76 (1968)
9. BRACK, W.G.A. Anatomical conditions in the dog that
 favour dermatitis
 J.Am.Vet.Med.Ass. 127, 312 - 313 (1955)
10. BRAUNSTEINER, H., Isolierung und Anreicherung funktions-
 PAKESCH, F., tüchtiger Leukozyten und Thrombozyten
 VETTER, H. mittels Polyvinyl-Pyrrolidin
 Acta haemat. 8, 304 - 308 (1952)

11. BREED, R.S.,
MURRAY, E.G.D.,
SMITH, N.R. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology
The Williams + Wilkins Company, Baltimore (1957)

12. BUCKLEY, E.S.,
POWELL, M.J.,
GIBSON, J.G. The separation of the formed elements of whole blood by means of fraction I
J.Lab.Clin.Med. 36, 29 - 39 (1950)

13. DENNIS, E.W. Experimental granulopenia due to bacterial toxins elaborated in vivo
J.exptl.Med. 57, 993 - 1008 (1933)

14. DENYS, J.,
VAN DE VELDE, H. Sur la production d'une antileucocidine chez les lapins vaccinés contre le staphylocoque pyogène
Cellule 11, 359 - 372 (1895)

15. DOUGLAS, W.W.,
POISNER, A.M. On the mode of action of acetylcholine in evoking adrenal medullary secretion: increased uptake of calcium during the secretory response
J.Physiol. 162, 385 - 392 (1962)

16. EARLE, W.R.,
SCHILLING, E.L.,
STARK, T.H.,
STRAUSS, N.P.,
BROWN, M.F.,
SHELTON, E. Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells
J.Nat.Cancer Inst. 4, 165 - 212 (1943)

17. EAGLE, H. Nutritional needs of mammalian cells in tissue culture
Science 122, 501 - 504 (1955)

18. EIKMEIER, H. Acne, Acne follicularis, Folliculitis, Haarbalgantzündung
In: "Wamberg, E.: Handlexikon der Tierärztlichen Praxis.", Teil I, Kapitel 23, 23 - 23 d
Medical Book Company, Kopenhagen (1970)

19. ELEK, S.D. Distribution of haemolysin in pathogenic staphylococci
J.Path.Bact. 62, 541 - 554 (1950)

20. ELSWORTH, R.,
SARGEANT, K. Production of test toxin of P-V Leuco-
cidin
In: "Montie, T.C., Kadis, S., Ajl, S.J.
Microbial Toxins" Vol.III, 357 - 360
Academic Press, New York + London
(1970)
21. FLAUM, A. Studies in staphylococci and staphylococ-
cal immunity
Acta path.microbiol.Scand. 35, 1 - 137
(1938)
22. GILLESPIE, W.A.,
ALDER, V.G. Production of opacity in egg yolk media
by coagulase-positive staphylococci
J.Path.Bact. 64, 187 - 200 (1952)
23. GLADSTONE, G.P. Staphylococcal leucocidin toxoid
Brit.J.exptl.Pathol. 46, 292 - 307 (1965)
24. GLADSTONE, G.P. Staphylococcal haemolysins
Postepy Mikrobiologii t.V.z. 2, 145 - 161
(1966)
25. GLADSTONE, G.P.,
FILDES, P. A simple culture medium for general
use without meat extract or peptone
Brit.J.exptl.Pathol. 21, 161 - 173 (1940)
26. GLADSTONE, G.P.,
GLENCROSS, E.J.G. Growth and toxin production of staphylo-
cocci in cellophan sacs *in vivo*
Brit.J.exptl.Pathol. 41, 313 - 333 (1960)
27. GLADSTONE, G.P.,
MUDD, S.,
HOCHSTEIN, H.D.,
LENHART, N.A. The assay of anti-staphylococcal leuco-
cidal components (F and S) in human
serum
Brit.J.exptl.Pathol. 43, 295 - 312 (1962)
28. GLADSTONE, G.P.,
VAN HEYNINGEN, N.E. Staphylococcal leucocidins
Brit.J.exptl.Pathol. 38, 123 - 137 (1957)
29. VON GLAHN, W.C.,
WELD, J.T. The effect of Staphylococcus aureus
toxin on the kidney
J.exptl.Med. 61, 1 - 8 (1935)
30. GRABAR, P.,
WILLIAMS, C.A. Méthode permettant l'étude conjuguée
des propriétés électrophorétique et im-
munochimique d'un mélange de protéines.
Application au sérum sanguin.
Biochim.Biophys.Acta 10, 193 - 194
(1953)

42. KANOE, M.,
BLOBEL, H.,
SCHAEG, W.,
WENK, K. Partielle Reinigung von Panton-Valentine-
Leukozidin von Staphylococcus aureus
Z.Naturforsch. 26b, 621 (1971)

43. KISSMEYER-NIELSEN, F., Lymphocytotoxic-micro techniques, p.15
KJERBY, K.E. National Inst.Health Bethesda, Maryland,
USA (1969)

44. KRAL, F.,
NICHOLS, A.C. Bacteriology, clinical syndrome, and bis-
muth therapy of pyogenic dermatitis of
dogs
J.Am.Vet.Med.Ass. 135, 391 - 397
(1959)

45. KRAL, F.,
SCHWARTZMAN, R.M. Veterinary and comparative dermatology
J.B.Lippincott Company, Philadelphia +
Montreal (1964)

46. KWARECKI, K.,
SZMIGLIELSKI, S.,
JELJASZEWICZ, J.,
ZAK, C. Injury of the rat peritoneal mast cells
in vivo by staphylococcal alpha-haemoly-
sin and leucocidin
J.Infect.Dis. 118, 360 - 364 (1968)

47. LACK, C.H.,
TOWERS, A.G. Serological tests for staphylococcal in-
fection
Brit.Med.J. 2, 1227 - 1230 (1962)

48. LEHMAN, R.A.,
FASSETT, D.W. Experimental and clinical studies on oral
bistrimate (sodium bismuth triglycolla-
mate) for systematic bismuth therapy
Am.J.Syph. 31, 640 - 656 (1947)

49. LOWRY, O.H.,
ROSEBROUGH, N.J.,
FARR, A.L.,
RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol
reagent
J.biol.Chem. 193, 265 - 275 (1951)

50. MEYER, W. Über die Brauchbarkeit des Koagulase-
tests mit verschiedenen Plasmaarten zur
Differenzierung von Staphylococcus-aureus-
Stämmen
Zbl.Bakt. 201, 331 - 338 (1966)

51. MEYER, W. Über die Brauchbarkeit des Kristall-
violett-Testes zur Differenzierung von

Staphylococcus-aureus-Stämmen
Zbl. Bakt. 153, 158 - 169 (1967)

52. MINOR, A.H.,
BURNETT, L.
A method for obtaining living leukocytes from human peripheral blood by acceleration of erythrocyte sedimentation
Blood 3, 799 - 802 (1948)
53. MÜLLER, H.,
WILLE, H.
Eigenserumtherapie bei der Furunkulose des Hundes.
D.T. Wschrft. 39/40, 456 - 458 (1953)
54. VON LINGELSHEIM, W.
Ätiologie und Therapie der Staphylokokkeninfektionen
In: "v. Behring, E.: Beiträge zur experimentellen Therapie."
Urban + Schwarzenberg, Berlin + Wien (1900)
55. NAGEL, W.,
LAHANN, H.,
WEIHRAUCH, E.-L.
Isolierung von Lymphozyten aus peripherem Blut
Kl. Wschrft. 36, 34 - 37 (1958)
56. NEISSER, M.,
WECHSBERG, F.
Ueber eine einfache Methode zur Beobachtung von Schädigungen lebender Zellen und Organismen
M. Med. Wschrft. 37, 1261 - 1262 (1900)
57. NEISSER, M.,
WECHSBERG, F.
Über das Staphylotoxin
Z. Hyg. Inf. Krkht. 36, 299 - 349 (1901)
58. NOBLE, P.B.,
CUTTIS, J.H.
Separation of blood leucocytes by ficoll gradient
Canad. Vet. J. 8, 110 - 111 (1967)
59. NOVICK, R.P.
Analysis by transduction of mutations affecting penicillinase formation in Staphylococcus aureus
J. gen. Microbiol. 33, 121 - 136 (1963)
60. ONCLEY, J.L.,
COHN, E.J.
Properties of plasma proteins with special reference to their interactions with the formed elements of the blood.
In: "Minutes of Conference on The Preservation of the Formed Elements and of the Proteins of the Blood", Boston, Mass.
American National Red Cross, p.78 (1949)

61. OTTO, F. Granulozytenisolierung aus dem Blut des Menschen und der Tiere
Blut 21, 290 - 294 (1970)
62. OTTO, F.,
SCHMID, D.O. Lymphozytenisolierung aus dem Blut des Menschen und der Tiere
Blut 21, 118 - 122 (1970)
63. PANTON, P.N.,
VALENTINE, F.C.O. Staphylococcal toxin
Lancet 222, 506 - 508 (1932)
64. PANTON, P.N.,
VALENTINE, F.C.O.,
DIX, V.W. Staphylococcal infection and antitoxin treatment
Lancet 221, 1180 - 1183 (1931)
65. PARKER, R.C. Nutrition of animal cells in tissue culture. I Initial studies on a synthetic medium
Proc.Soc.exptl.Biol.Med. 73, 1 - 8 (1950)
66. PICKUP, D.M. Extraction of lymphocytes from rabbit's blood
Nature 164, 959 (1952)
67. PILLSBURY, D.M.,
NICHOLS, A.C. Bacterial flora of the normal and infected skin: an evaluation of various methods of performing skin cultures
J.Invest.Dermatol. 7, 365 - 372 (1946)
68. POMMER, A.,
POBISCH, R. Die Akne des Hundes und ihre Behandlung mit Röntgenstrahlen
W.Tierärztl.Mschrft. 45, 273 - 283 (1958)
69. PROOM, H. The interrelationships of staphylococcal leucocidins
J.Path.Bact. 44, 425 - 429 (1937)
70. RAJULU, P.S.,
FOLTZ, V.D.,
LORD, T.H. The canine as a reservoir of pathogenic staphylococci
Am.J.pub.Health and Nations' Health 50, 74 - 78 (1960)
71. REMMELE, W.,
BRÜCKEL, K.W. Die Isolierung der weißen Blutzellen des Menschen und Untersuchung des Leukozytenstoffwechsels im Warburg-Apparat. -

- Methodische Übersicht-Röntgen-+ Laboratoriums-Praxis VIII/9, 237 - 245 (1956)
IX/1, 13 - 16 (1956)
72. RIGDON, R.H. Effect of staphylococcus toxin on the dog's blood pressure
Arch.Path.(Chicago) 20, 201 - 208 (1936)
73. RIGDON, R.H. Some of the experimental lesions produced by staphylococcus toxin
South.Med.J. 32, 798 - 802 (1939)
74. ROBERTS, H.S.,
ANDERSON, N.G. Studies on isolated cell components. III
A cytological study of the effects of heparin on isolated nuclei
Exp.Cell.Res. 2, 224 - 234 (1949)
75. ROBINSON, J.J. The technic and significance of anti-streptolysin O and anti-streptolysin S determinations
Naval Med.Res.Unit No. 4 (1950)
76. ROGERS, D.E.,
TOMPSETT, R. The survival of staphylococci within human leukocytes
J.exptl.Med. 95, 209 - 230 (1952)
77. SCHEIDY, S.F.,
KRAL, F.,
RAKER, S.W. Enzymatic debridement
Proceeding Book
Am.Vet.Med.Ass. 91, 394 - 398 (1954)
78. SKEGG, J.L.,
ANDERSON, S.G. International reference preparation of anti-staphylococcal P-V-leucocidin serum
Bull.Wld.Hlth.Org. 40, 593 - 600 (1969)
79. SMITH, R.F.,
WILLETT, N.P. Rapid plate method for screening hyaluronidase and chondroitin sulfatase-producing microorganisms
Appl.Microbiol. 16, 1434 - 1436 (1968)
80. SOBOLL, H. Panton-Valentine-Leukozidin bei Staphylokokken vom Rind
Inaugural-Dissertation, Giessen (1971)
81. SOUCKOVA-STEPANOVA, J. The immunization of rabbit with staphylococcal leucocidin toxoid
Brit.J.exptl.Pathol. 46, 384 - 407 (1965)

82. SPEAR, F. Separation of leucocytes from whole blood by flotation on Gummi acocia. Blood, 3, 1055 - 1056 (1948)
83. STARLINGER, W. Zur Methodik der Reingewinnung nativer menschlicher Leukozyten W.Kl.Wschrft. 8, 172 - 173 (1922)
84. STEIN, Ph. Tierexperimentelle Untersuchungen über die Bedeutung des Staphylokokken-Anti- α -Hämolysins und des Anti-P-V-Leukozidins für den Schutz vor Staphylokokkeninfektionen Behringwerk-Informationen 61, 61 - 78 (1966)
85. SZMIGLIELSKI, S., JELJASZEWICZ, J., WILCZYNSKI, J. Function of the leucocytic system in the rabbit in the course of experimental staphylococcal infection Exp.Med.Microbiol. 17, 214 - 224 (1965)
86. THIMM, J.-J. Übersicht über die Verfahren zur Gewinnung von Leukozyten und Prüfung des Hämolysen-Verfahrens nach Behrens und Esch am Blut von Mensch, Hund, Ente, Kaninchen, Pferd, Schaf, Ziege Inaugural-Dissertation, Giessen (1964)
87. TOWERS, A.G., GLADSTONE, G.P. Two serological tests for staphylococcal infection Lancet 2, 1192 - 1195 (1958)
88. TULLIS, J.L. Separation and purification of leukocytes and platelets Blood, 7, 891 - 896 (1952)
89. TAMAKI, S. Experimentelle Studien über das Staphylolysin und Leukozidin von pathogenen Staphylokokken Fukouka Ikwadaigaku Zasshi 21, 14 - 16 (1928)
90. VALENTINE, F.C.O. Further observations on the role of the toxin in staphylococcal infection Lancet 230, 526 - 531 (1936)

91. VALENTINE, F.C.O.
BUTLER, E.C.B. Specific immunity in acute staphylococcal
osteomyelitis
Lancet 234, 973 - 977 (1939)
92. VAN DE VELDE, H. Etude sur le mécanisme de la virulence
du staphylocoque pyogène
Cellule 10, 401 - 410 (1894)
93. VIDAL, G. Vaccination avec la leucocidine dans la
mammite staphylococcique de la brébis
Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 8(2),
291 - 299 (1968)
94. WELD, J.T.P.,
GUNTHER, A. Certain toxic properties of filtrates of
haemolytic
Staphylococcus aureus
J. exptl. Med. 54, 315 - 322 (1931)
95. WELLS, E.A. Staphylococcus pyogenes septicaemia in
a bitch
The Vet. Record 30, Vol. 65, 607 (1953)
96. WENK, K. Leukozide Substanzen von Staphylokokken
Inaugural-Dissertation, Giessen (1969)
97. WEINHOLD, E. Gewinnung weißer Blutkörperchen des
Rindes für die Zellkultur
B.M. Tierärztl. Wschrft. 21, 406 - 408
(1965)
98. WOODIN, A.M. Fractionation of a leucocidin from
Staphylococcus aureus
Biochem. J. 73, 225 - 237 (1959)
99. WOODIN, A.M. Purification of the two components of
leucocidin from Staphylococcus aureus
Biochem. J. 75, 158 - 165 (1960)
100. WOODIN, A.M. Assay of the two components of staphy-
lococcal leucocidin and their antibodies
J. Bact. Path. 81, 63 - 68 (1961)
101. WOODIN, A.M. The extrusion of protein from the rabbit
polymorphnuclear leucocyte treated with
staphylococcal leucocidin
Biochem. J. 82, 9 - 15 (1962)

102. WOODIN, A.M. Staphylococcal leucocidin
In: "Montie, T.C., Kadis, S., Ajl,
S.J.: Microbial Toxins", Vol. III,
327 - 355
Academic Press, New York + London
(1970)
103. WRIGHT, J. Staphylococcal leucocidin, (Neisser-
Wechsberg-type) and anti-leucocidin
Lancet 230, 1002 - 1004 (1936)
104. YOSHIDA, A. Staphylococcal ϕ - haemolysin
Biochim.biophys.Acta 71, 544 - 553
(1963)

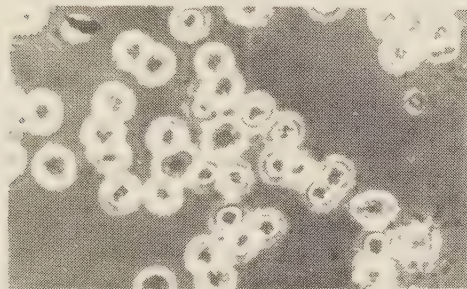
ANHANG

Abbildung 7

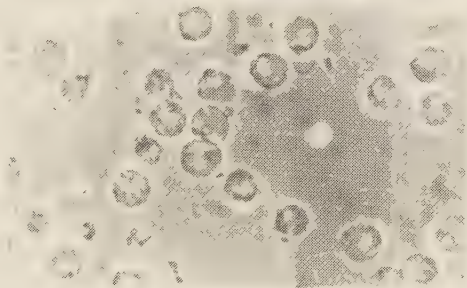
Hundeleukozyten vor (1) und nach (2) der Einwirkung von "caninem"
PVL. Einwirkungsdauer 1 Std.

Hundeleukozyten

1



2



Die Photographien der Abb. 7 sind phasenkontrastmikroskopische
Aufnahmen bei 320-facher Vergrößerung (Objektiv: Neofluar ⁽¹⁾
40/0, 75, Belichtungszeit 1/30 Sek.

(1) Carl Zeiss, Oberkochen, Württemberg

Herrn Professor Dr. H. Blobel möchte ich für die Themastellung und die jederzeit freundlich gewährte Unterstützung danken.

Frau Dr. H. Soboll möchte ich für die Zusammenarbeit und die vielen unterstützenden Ratschläge danken.

Herrn Prof. Dr. Dengler, Medizinische Kliniken und Polikliniken der Justus Liebig-Universität danke ich für die jederzeit zur Verfügung gestellte Unterstützung seiner Medizinisch-Technischen Assistentinnen bei der Blutentnahme von seinen Patienten.

Den Direktoren und Assistenten der verschiedenen Kliniken und Instituten der Veterinärmedizinischen Fakultät danke ich für die gewährte Unterstützung bei der Blutbeschaffung von verschiedenen Tieren.

Endlich gilt mein Dank der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die mir durch die zeitweilige Gewährung eines Stipendiums die Fortführung der Arbeit ermöglichte.

Als letztes möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Bakteriologie und Immunologie für ihre jederzeit gewährte Hilfe bedanken.

LEBENS LAUF

- 1943 5. Juni in Berlin-Charlottenburg geboren
- 1950 - 54 Volksschule in Opladen/Rheinland
- 1954 - 60 Realschule Am Neuenhof in Leverkusen
- 1960 - 65 Aufbaustufe für Realschulabsolventen am Freiherr-
vom-Stein-Gymnasium in Leverkusen
26. Februar Reifeprüfung
- 1965 Im Sommersemester Student der Naturwissenschaft-
lichen Fakultät an der Universität in Köln
- 1965 - 70 Studium der Veterinärmedizin an der Justus Liebig-
Universität in Giessen
- 1970 Dreimonatige Praktikantenzeit an der Chirurgischen
und Medizinischen Veterinärklinik, sowie am Veteri-
närpathologischen Institut der Justus Liebig-Universität
in Giessen
- 1971 11. Juni Tierärztliche Prüfung
- 1971 21. Juni Approbation als Tierarzt
- 1971 - 72 1. August 71 Anfertigung einer Dissertation am Institut
für Bakteriologie und Immunologie der Justus Liebig-
Universität unter Anleitung von Herrn
Prof. Dr. H. Blobel

